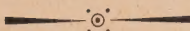


# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VALEUR DU TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES



## THESE

présentée à la

FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY

MENTION "PHARMACIE"

par

**ETIENNE LEVY**  
*Pharmacien*

*Ex. Préparateur de Pharmacodynamie*

*Ancien Interne et Lauréat de l'Internat*

*des Hôpitaux de Nancy*

*Ancien Chef du Laboratoire du Test de Nelson*

*de l'O.H.S. de Meurthe et Moselle*

*Diplômé d'études spéciales de Sérologie*

*Né le 30 août 1935 à NANCY (M.M.)*

Soutenue le **26 OCT. 1961** devant la Commission d'examen

Président : M. MARCHAL Professeur

Juges : { Mlle. BESSON Professeur  
M. BENE Maître de Conférences. Agrégé

Adjoint au jury : M. BEUREY Professeur agrégé à la  
Faculté de Médecine de Nancy





CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VALEUR DU TEST  
D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

ETIENNE LEVY

La thèse est déposée au Ministère de l'Enseignement Supérieur

et est soumise au dépôt légal de la Bibliothèque Nationale

le 14 octobre 1961

Le Directeur de la Bibliothèque de la Faculté de Médecine

de la Faculté de Médecine de Paris

docteur en Médecine

de la Faculté de Médecine de Paris

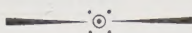
Soutenue le 26 OCT 1961 devant la Commission d'Examen

président M. LAFONT





# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VALEUR DU TEST D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES



## THESE

présentée à la

FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY

MENTION " PHARMACIE "

par

**ETIENNE LEVY**

*Pharmacien*

*Ex-Préparateur de Pharmacodynamie*

*Ancien Interne et Lauréat de l'Internat*

*des Hôpitaux de Nancy*

*Ancien Chef du Laboratoire du Test de Nelson*

*de l'O.H.S. de Meurthe et Moselle*

*Diplômé d'études spéciales de Sérologie*

*Né le 30 août 1935 à NANCY (M.M.)*

Soutenue le **26 OCT. 1961** devant la Commission d'examen

Président : M. MARCHAL Professeur

Juges : { Mlle. BESSON Professeur  
M. BENE Maître de Conférences. Agrégé

Adjoint au jury : M. BEUREY Professeur agrégé à la  
Faculté de Médecine de Nancy

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VALEUR DU TEST  
D'IMMOBILISATION DES TREPONEMES

THESE

DE DOCTORAT

DE LA FACULTE DE MEDECINE

DE L'UNIVERSITE DE WAGeningen

DOCTEUR EN MEDECINE DE WAGeningen



28 OCT 1981

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE NANCY

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE PRINCIPAL

B. SEUROT

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

|      |                 |                     |
|------|-----------------|---------------------|
| M.   | MEUNIER A.      | Pharmacie galénique |
| Mlle | FRANCOIS M. Th. | Matière médicale    |
| MM.  | KAYSER F.       | Chimie              |
|      | FRANQUET R.     | Botanique           |
|      | MARCHAL J. G.   | Microbiologie       |
|      | STEIMETZ E.     | Sciences naturelles |
|      | BLOCH J. M.     | Toxicologie         |
|      | SOLEIL J.       | Pharmacie chimique  |
|      | BERNANOSE A.    | Physique            |
| Mlle | BESSON S.       | Pharmacodynamie     |

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

|     |                        |                            |
|-----|------------------------|----------------------------|
| MM. | BENE R.                | Microbiologie              |
|     | MIRJOLET M. (délégué)  | Sciences physico-chimiques |
|     | PIERFITTE M. (délégué) | Chimie biologique          |





## CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

|      |                                               |                                                         |
|------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| M.   | MEUNIER A.                                    | Hydrologie                                              |
| Mlle | FRANCOIS M. Th.                               | Hygiène                                                 |
| MM.  | KAYSER F.                                     | Biochimie technique                                     |
|      | FRANQUET R.                                   | Cryptogamie                                             |
|      | MARCHAL J. G.                                 | Parasitologie                                           |
|      | STEIMETZ E.                                   | Mycologie-Minéralogie                                   |
|      | BLOCH J. M.                                   | Chimie minérale                                         |
|      | SOLEIL J.                                     | Chimie organique                                        |
|      | BERNANOSE A.                                  | Optique et acoustique                                   |
|      | GRANGER (Professeur à la<br>Faculté de Droit) | Déontologie                                             |
| Mlle | BESSON S.                                     | Techniques spéciales et méthodes<br>modernes d'analyses |
| MM.  | BENE R.                                       | Bactériologie                                           |
|      | ANZIANI P.                                    | Caractères analytiques des sels                         |
| Mme  | LASSEUR A.                                    | Techniques spéciales d'analyses<br>bactériologiques     |
| MM.  | MIRJOLET M.                                   | Chimie analytique                                       |
|      | PIERFITTE M.                                  | C. E. S. Chimie biologique                              |
| Mlle | HEINRICH S.                                   | Matière médicale                                        |

## CHEFS DE TRAVAUX

|      |                            |                             |
|------|----------------------------|-----------------------------|
| M.   | ANZIANI P.                 | Chimie                      |
| Mme  | LASSEUR A.                 | Microbiologie-Parasitologie |
| MM.  | VILLOUTREIX J. (Stagiaire) | Micrographie                |
|      | MARTIN J. A. (Délégué)     | Chimie                      |
| Mlle | GIRARD Th.       " "       | Microbiologie technique     |
| Mlle | LAURENT F.       " "       | Physique                    |
| Mlle | DAUCHY S.       " "        | Chimie biologique           |
| Mlle | HEINRICH S.       " "      | Sciences pharmaceutiques    |

Doyen honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de  
MONTPELLIER.

Professeurs honoraires : M. CORDEBARD - M. DOURIS.

---o0o---

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.





A MA GRAND ' MERE

A MES PARENTS

A MES FRERES ET SOEURS ET A LEURS FAMILLES

A MES PROCHES

A MES AMIS

.\_.\_.\_.\_.\_.\_.\_.\_.\_.\_



A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur MARCHAL  
Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie  
de Nancy  
Pharmacien des Hôpitaux

-----

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur BESSON  
Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté  
de Pharmacie de Nancy

Monsieur BENE  
Maître de Conférences - Agrégé de Microbiologie à la  
Faculté de Pharmacie de Nancy

-----

Monsieur le Professeur agrégé BEUREY  
Professeur agrégé de Dermatologie-Vénéréologie  
à la Faculté de Médecine de Nancy  
Médecin des Hôpitaux

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE  
NANCY





Travail réalisé au Laboratoire du Test de Nelson de l'Office  
d'Hygiène Sociale de Meurthe et Moselle.



Avant de passer à l'exposé de nos recherches, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Monsieur le Doyen J. PARISOT, Président de l'Office d'Hygiène Sociale de Meurthe et Moselle qui nous a accordé une aide très précieuse pour la réalisation de ce travail.

Qu'il nous soit permis également d'adresser nos sincères remerciements à tout le personnel des Laboratoires, de la Clinique Dermatologique et du Dispensaire de l'Hôpital Fournier de Nancy, qui nous a apporté une collaboration très utile et nous a toujours entouré d'une vive sympathie.





INTRODUCTION  
=====



## INTRODUCTION

=====

En 1949, Nelson et Mayer (98) mettaient au point une nouvelle épreuve sérologique de la syphilis :

le "Treponema pallidum immobilisation test" (T. P. I. test connue en France sous le nom de "Test d'Immobilisation des tréponèmes", (T. I. T. ).

Depuis lors, malgré les difficultés pratiques de sa réalisation, des laboratoires spécialisés de plus en plus nombreux, exécutent cette réaction qui s'est révélée spécifique des tréponématoses. Elle est particulièrement utilisée dans le diagnostic et la surveillance de la syphilis. Actuellement, l'intérêt du T. I. T. se trouve accru du fait de la récente augmentation de la morbidité syphilitique, signalée tant en France (61), (154), (160), que dans de nombreux autres pays (53), (70).

L'Office d'Hygiène Sociale créait en 1958 à l'Hôpital Fournier de Nancy un Laboratoire chargé de pratiquer le T. I. T. , Monsieur le Professeur J. BEUREY a bien voulu nous y confier un poste. Nous avons pu ainsi examiner plus de 4000 sérums sanguins et plus de 300 liquides céphalorachiens de sujets syphilitiques ou sains. Ce matériel d'étude provenait de la Clinique Dermatologique de l'Hôpital Fournier de Nancy, de l'ensemble du Centre Hospitalier Régional de Nancy, et de différents Laboratoires et Hôpitaux de l'Est de la France. Il nous a permis d'étudier plus spécialement la reproductibilité et la sensibilité du T. I. T. en fonction des différents facteurs de la réaction. Nous avons pu aussi comparer les résultats obtenus à ceux fournis par la sérologie "classique", utilisant les antigènes lipidiques et les réactions exécutées au moyen d'antigènes tréponémiques. Telles sont les recherches qui font l'objet de ce travail.

### Les anticorps tréponémiques :

L'examen des différents travaux consacrés à la recherche d'anticorps tréponémiques fait ressortir une difficulté commune qui réside dans l'impossibilité encore actuelle où se trouvent les chercheurs de cultiver *in vitro* *Treponema pallidum* (87).





Les réactions proposées pour mettre en évidence ces anticorps, ont d'abord mis en contact les immunsérums avec un antigène tréponémique prélevé sur des lésions de sujets humains syphilitiques ou d'animaux syphilitisés expérimentalement. Ainsi, l'emploi, d'extraits de foies d'hérédosyphilitiques par Wassermann, Neisser et Brucke (172) pour l'application à la recherche des anticorps tréponémiques de la réaction de fixation de Bordet-Gengou, puis leur remplacement par des extraits de foies normaux par Levaditi et Marie (77) ont donné naissance à la sérologie dite "classique" de la syphilis. Les travaux de Pangborn (114) ont universalisé l'emploi des antigènes lipidiques préparés à partir de tissus animaux variés, et principalement de muscles cardiaques. Enfin, plus récemment, Reznikova (135) a préparé des antigènes d'origine végétale (soja, amande, arachide...) d'égale valeur. Tous ces antigènes, utilisés dans les réactions de floculation et d'hémolyse, ont permis de détecter la présence d'une substance anormale, la réagine, dans le sérum sanguin de sujets atteints de tréponématose, et plus exceptionnellement dans celui d'individus souffrant des troubles les plus divers.

Le manque de spécificité des antigènes utilisés a conduit à douter de la valeur immunologique absolue de ces réactions et à rechercher de véritables anticorps dans le sang des syphilitiques. Toutes les tentatives faites jusqu'ici, en dehors du T. I. T., n'ont pas encore permis d'atteindre véritablement ce but.

En effet, les réactions d'agglutination et de lyse, mises à profit dans d'autres affections, se sont révélées peu spécifiques et peu fidèles (153), dans le diagnostic des tréponématoses. Les nombreuses autres réactions, plus récentes, telles que les réactions d'immuno-adhérence (23) (96), et d'immuno-fluorescence (26) (45) (103), sont difficiles à reproduire et mettent en jeu des anticorps non encore définis.

Touraine (159), (161), en 1912, en étudiant le pouvoir agglutinant du sérum de syphilitique, avait déjà constaté que les tréponèmes, mis en sa présence, perdaient leur mobilité avant de s'agglutiner.

L'atténuation de la virulence des tréponèmes mis au contact de sérums syphilitiques, démontrée par EBERSON (36), avait amené TURNER (163), en 1931, à mettre en évidence le pouvoir protecteur de ces sérums : c'est ainsi que des tréponèmes, mis en contact avec de tels sérums et du complément, perdaient tout pouvoir pathogène vis à vis du lapin, alors que, traités dans les mêmes conditions par le sérum de sujet sain, ils entraînaient encore l'apparition d'un chancre caractéristique.



Le phénomène d'immobilisation in vitro des tréponèmes sous l'action d'anticorps correspondants, présents dans le sérum des malades syphilitiques, devait conduire deux élèves de TURNER, NELSON et MAYER à mettre au point le T. I. T. Les anticorps révélés par cette réaction furent dénommés : immobilisines.

Pour mettre à profit le phénomène d'immobilisation, NELSON (94) eut le mérite de réaliser un milieu capable de conserver vivant le tréponème en dehors d'un organisme animal, et ceci assez longtemps pour permettre son immobilisation par les immobilisines sériques. Il devait ensuite avec l'aide de MAYER (98), mettre au point une technique reproductible et utilisable pour le diagnostic sérologique de l'ensemble des tréponématoses.

### Principe du T. I. T.

Le T. I. T. apparaît comme une réaction antigène-anticorps qui consiste à mettre en contact :

- 1° Un antigène constitué par une suspension de tréponèmes vivants,
- 2° Un sérum à expertiser pouvant contenir des anticorps immobilisants,
- 3° Du complément apporté par du sérum sanguin frais de cobaye.

Il suffit alors de constater si, dans de telles conditions, le microorganisme s'immobilise ou non. L'intensité de la réaction est exprimée par le pourcentage de tréponèmes ayant perdu leur mobilité du fait de l'action des immobilisines renfermées par le sérum examiné.

Le T. I. T. semble donc une réaction facile à pratiquer ; il ne faut pas cependant sous-estimer les multiples difficultés de sa réalisation. Les unes résident dans la préparation de l'antigène (obtention de tréponèmes par culture in vivo chez le lapin), les autres dans sa fragilité, ce qui implique le maintien des tréponèmes en survie (en anaérobiose), dans un milieu adéquat, et durant un temps suffisamment long pour permettre aux anticorps d'exercer leur action.

### Technique générale

La pratique du T. I. T. comporte :



- 1° La conservation de la souche de tréponèmes qui nécessite l'inoculation de lapins sous forme d'une injection intratesticulaire de tréponèmes virulents qui entraînera l'apparition précoce d'une orchite syphilitique aigue d'évolution rapide,

- 2° La préparation de la suspension antigénique : les tréponèmes sont extraits des testicules syphilitisés du lapin ayant présenté une orchite, et maintenus vivants dans un milieu de survie liquide pour constituer la suspension antigénique,

- 3° La mise en présence des réactifs : le sérum à étudier, le complément, la suspension antigénique sont répartis suivant un protocole dans lequel entre une série de différents témoins de la réaction,

- 4° Le contact nécessaire pour que se produise l'immobilisation des spirochètes par les immobilisines (22 heures), après mise en atmosphère anaérobie,

- 5° La lecture du test qui consiste dans l'observation, à l'ultra microscope, de l'immobilisation ou de la survie des tréponèmes, et l'expression des résultats obtenus.

La technique originale décrite par NELSON et MAYER (98) a été étudiée par différents laboratoires qui ont proposé diverses modifications portant sur la composition du milieu de survie, sur les quantités de réactifs à utiliser, sur le temps de réaction etc... Actuellement, il existe un très grand nombre de techniques dont la multiplicité est préjudiciable à la réaction. L'Office Mondial de la Santé (111) a signalé cet inconvénient en ces termes :

"Il y a presque autant de techniques que de laboratoires.. Que deviendrait la réaction de KLINE si chaque laboratoire la pratiquant modifiait à sa guise la préparation de l'antigène ou les concentrations à utiliser par la réaction ?...". Il faut espérer l'établissement d'une technique standard sous l'égide de l'O. M. S. de telle sorte que toutes les études intéressant l'immunologie des tréponématoses soient réellement comparatives.

Nous indiquons d'abord les résultats d'une étude concernant les deux problèmes essentiels de l'exécution du T. I. T. : la conservation in vivo des tréponèmes, matériel antigénique, et la réalisation de leur survie in vitro. Ce travail a permis de retenir des améliorations et des simplifications proposées par différents auteurs, et d'adopter une technique précise, en tenant compte également des conclusions de nos investigations personnelles. Nous





donnons un exposé détaillé de la technique ainsi fixée.

La reproductibilité des résultats de T. I. T. obtenus grâce à cette technique a pu alors être évaluée et les différents facteurs qui l'influencent ont été recherchés et analysés.

Enfin la valeur des résultats de T. I. T. a pu être comparée à celle des indications fournies par les réactions utilisant d'autres antigènes tréponémiques ou cardiolipidiques.

ooo0ooo



CHAPITRE I  
=====

CONSERVATION DE LA SOUCHE DE TREPONEMES  
=====



## CHAPITRE I

=====

### CONSERVATION DE LA SOUCHE DE TREPONEMES

=====

Les tréponèmes qui servent à exécuter le test d'immobilisation sont donc des germes virulents entretenus par passages successifs de lapin à lapin. L'inoculation intra-testiculaire, ainsi pratiquée sur l'animal, doit provoquer l'apparition d'une orchite de richesse tréponémique suffisamment élevée pour rendre possible l'exécution d'une série de tests. Avant d'entreprendre l'examen des conditions qui permettent d'obtenir un matériel antigénique important et constant, nous signalons l'origine et la virulence de la souche de tréponèmes qui a été utilisée dans tous nos essais.

#### 1) Origine et virulence de la souche de tréponèmes :

La souche de tréponèmes employée pour l'exécution du T. I. T. est la souche NICHOLS. Elle a été isolée en 1912 par NICHOLS et HOUGH (99) d'une lésion humaine, dans les conditions suivantes : Un marin de 25 ans présenté en 1911 un chancre syphilitique, et malgré un traitement par le salvarsan, une syphilis nerveuse se déclara en mai 1912 avec des réactions sérologiques positives dans le sang et négatives dans le L. C. R. Le 30 Juin 1912, du liquide céphalo-rachidien de ce malade fut injecté par voie intra-testiculaire à un lapin, à raison de 3,0 ml de liquide par testicule. Cinquante jours après l'inoculation, l'animal présenta une orchite très développée qui se révéla riche en tréponèmes et servit à inoculer d'autres lapins. Depuis lors, la souche de NICHOLS n'a cessé d'être ainsi entretenue.

L'évolution rapide de la maladie du patient de NICHOLS et HOUGH (apparition d'une syphilis nerveuse survenant 9 mois après l'accident primaire et malgré la thérapeutique) indique le caractère exceptionnellement virulent de la souche isolée. L'évolution rapide et aigue des orchites obtenues avec la souche NICHOLS l'ont fait choisir dans la pratique du T. I. T. Après 50 années d'utilisation en syphilis expérimentale, elle a, en effet, conservé sa virulence initiale, pour le lapin comme pour l'homme chez qui des contaminations accidentelles professionnelles ont été enregistrées par LEVADITI et





MARIE en 1919, par WAKERLIN en 1932, par DUREL et SAUSSE en 1954 (34). RANQUE (127) en 1960, observait l'apparition d'un accident primaire, 17 jours après l'inoculation accidentelle.

La souche NICHOLS nous a été aimablement fournie par le Laboratoire du Test de NELSON de l'Hôpital Saint-Louis de PARIS. Un lapin inoculé au moyen de *Treponema pallidum* - souche NICHOLS dans ce laboratoire fut ramené à NANCY et servit à inoculer 2 lapins neufs le 24 mars 1958. De cette date au 19 mai 1961, nous avons pratiqué 550 passages de la souche sans observer de perte de sa virulence. Seules 11 inoculations ne provoquèrent pas d'orchite syphilitique dans les 20 jours suivant l'injection intra-testiculaire (soit 2 % d'échecs).

## 2) Obtention d'un matériel antigénique constant et important :

L'inoculation de la souche NICHOLS au lapin doit entraîner :

- une apparition et une évolution rapide de l'orchite afin d'éviter un développement d'anticorps tréponémiques trop abondants chez l'animal.

- une richesse tréponémique suffisante dans les testicules afin de faciliter la préparation de la suspension antigénique. Le temps d'extraction des tréponèmes du testicule est ainsi écourté et l'entraînement du suc testiculaire réduit.

L'évolution de l'orchite est fonction de la qualité de l'inoculum et du lapin utilisé.

### a) Qualité de l'inoculum :

Elle dépend du milieu de dispersion des tréponèmes et de sa richesse tréponémique :

Milieu de base : Pour réaliser celui-ci, NELSON (98) avait recours à une solution à 5 % d'albumine bovine. BOREL (16), a pensé que le sérum de lapin était le substrat indiqué. Son emploi semble devoir réduire chez l'animal les possibilités d'un choc consécutif à l'inoculation. Sa moins bonne capacité d'extraction des tréponèmes, lors de la préparation de l'inoculum, ainsi que ses éventuelles propriétés tréponémicides nous l'ont fait rejeter.

L'utilisation d'un mélange à parties égales de milieu de survie et d'eau physiologique nous a permis d'obtenir un maximum de tréponèmes en



abrégant le temps d'extraction et de limiter les chocs réactionnels entraînés par l'inoculation. Cette manière de procéder permet l'emploi de testicules semi-épuisés et encore imprégnés de milieu de survie, après leur utilisation pour la préparation de la suspension antigénique. Ceci constitue une simplification de la manipulation.

### Richesse tréponémique de l'inoculum :

Nous avons étudié l'influence de la densité tréponémique sur le délai d'apparition de l'orchite et sur sa richesse en tréponèmes.

A cet effet, des suspensions de densité tréponémique variable, réalisées au moyen du mélange milieu de survie + eau physiologique, ont été injectées à des lapins à raison de 1,0 ml par testicule. Le délai d'apparition de l'orchite et sa richesse en tréponèmes ont été notés dans les tableaux suivants n° 1 et n° 2.

TABLEAU N° 1 - Délai d'apparition de l'orchite en fonction de la densité tréponémique de l'inoculum :

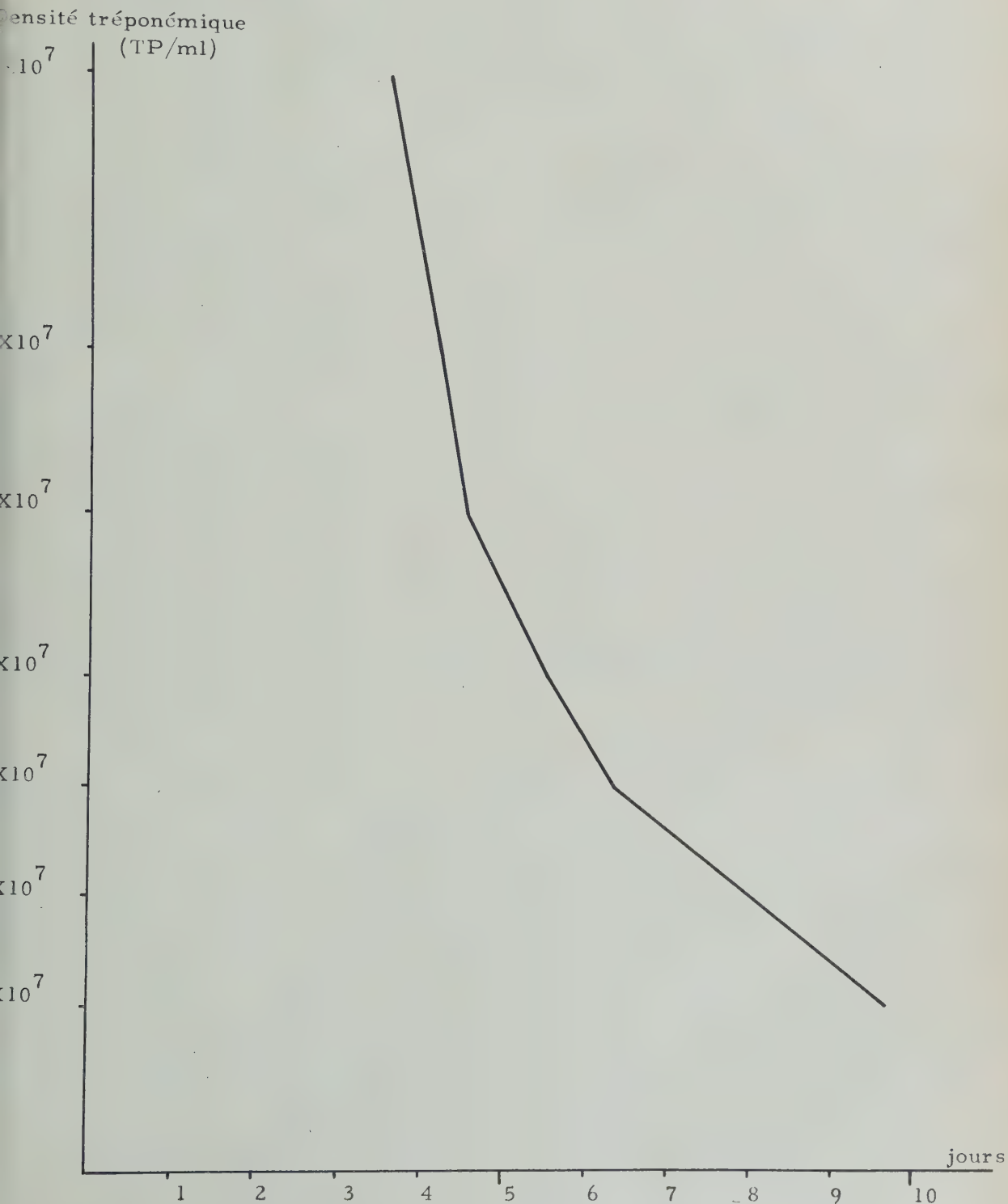
(La densité tréponémique de l'inoculum est exprimé en nombre de *Treponema pallidum* (TP) par champ microscopique - Oculaire 10-Objectif 40), 100 tréponèmes par champ correspondent dans ces conditions à  $20 \times 10^7$  tréponèmes par ml.)

| Nombre de lapins<br>inoculés | Densité tréponé-<br>mique de l'inocu-<br>lum | Nombre de lapins ayant montré un délai<br>d'apparition de l'orchite, exprimé en jours,<br>de : |    |     |     |    |    |    |   |          |          | Délai "moyen"<br>calculé |
|------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----|-----|----|----|----|---|----------|----------|--------------------------|
|                              |                                              | 2                                                                                              | 3  | 4   | 5   | 6  | 7  | 8  | 9 | 10<br>11 | 12<br>15 |                          |
| 4                            | 20-30 TP/champ                               |                                                                                                |    |     |     |    | 1  | 1  | 1 |          | 1        | 9,7 jours                |
| 15                           | 30-50 TP/champ                               |                                                                                                |    | 1   | 2   | 3  | 7  |    | 1 | 1        |          | 6,8 j.                   |
| 39                           | 50-70 TP/champ                               |                                                                                                |    | 3   | 8   | 15 | 5  | 5  | 2 |          | 1        | 6,4 j.                   |
| 105                          | 70-90 TP/champ                               |                                                                                                | 2  | 10  | 62  | 6  | 18 | 44 | 2 |          | 1        | 5,6 j.                   |
| 348                          | 90-120 TP/champ                              |                                                                                                | 14 | 120 | 198 | 10 | 3  | 2  |   | 1        |          | 4,6 j.                   |
| 22                           | 120-150 TP/champ                             | 1                                                                                              | 2  | 11  | 6   | 1  |    | 1  |   |          |          | 4,3 j.                   |
| 6                            | 150-200 TP/champ                             | 1                                                                                              | 1  | 3   | 1   |    |    |    |   |          |          | 3,6 j.                   |



Le délai "moyen" de l'apparition de l'orchite a pu être ainsi déterminé pour chaque densité tréponémique.

L'examen de ce tableau nous montre qu'une diminution de la densité tréponémique entraîne un allongement du délai d'apparition de l'orchite. Cette variation est exprimée par la courbe suivante n° 1 qui traduit les résultats du tableau n° 1.



GRAPHIQUE N° I : Variation du délai d'apparition de l'orchite en fonction de la densité tréponémique de l'inoculum.

Délai "moyen" d'apparition de l'orchite





TABLEAU N° 2 - Richesse tréponémique de l'orchite en fonction de la densité tréponémique de l'inoculum

| Nombre de lapins inoculés | Densité tréponémique de l'inoculum | Nombre de lapins ayant présenté une orchite de richesse tréponémique |         |             |       |            |
|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------|------------|
|                           |                                    | Pauvre                                                               | Moyenne | Assez riche | Riche | Très riche |
| 4                         | 20-30 TP/ch.                       | 4                                                                    |         |             |       |            |
| 15                        | 30-50 TP/ch.                       | 10                                                                   | 4       | I           |       |            |
| 39                        | 50-70 TP/ch.                       | 9                                                                    | 22      | 6           | 2     |            |
| 105                       | 70-90 TP/ch.                       | 14                                                                   | 60      | 26          | 5     |            |
| 348                       | 90-120 TP/ch.                      | 26                                                                   | 136     | 147         | 39    |            |
| 22                        | 120-150 TP/ch.                     | I                                                                    | 3       | 11          | 6     | I          |
| 6                         | 150-200 TP/ch.                     |                                                                      | I       | I           | 3     | I          |

La richesse tréponémique des testicules est exprimée au moyen d'un critère empirique :

après l'isolement des testicules syphilitisés du lapin, un fragment tissulaire de la grosseur d'une lentille est prélevé au sein du 1<sup>er</sup> testicule, pour être déposé dans une goutte d'eau physiologique (0,05 ml) sur une lame de verre, il y est agité au moyen d'une ôse de platine pendant 20 secondes, cette opération est répétée avec le 2<sup>ème</sup> testicule. Les préparations recouvertes de lamelle sont examinées à l'ultramicroscope afin de vérifier la présence de tréponèmes et d'en noter la quantité observée par champ microscopique. La richesse tréponémique des testicules est exprimée en fonction du nombre de tréponèmes notés par champ.

| Nombre de tréponèmes par champ microscopique<br>(Oculaire 10 - Objectif 40) | Richesse tréponémique du testicule |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1 à 5                                                                       | Pauvre                             |
| 6 à 10                                                                      | Moyenne                            |
| 11 à 20                                                                     | Assez riche                        |
| 21 à 50                                                                     | Riche                              |
| au dessus de 50                                                             | Très riche                         |



Les résultats rassemblés dans le tableau N° 2 ont été traduits en pourcentage dans le tableau suivant N° 3.

TABLEAU N° 3 - Richesse tréponémique de l'orchite en fonction de la densité tréponémique de l'inoculum :  
résultats exprimés en pourcentage.

| Densité tréponémique de l'inoculum | Pourcentage de lapins ayant présenté une orchite de richesse tréponémique |         |             |        |            |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|--------|------------|
|                                    | Pauvre                                                                    | Moyenne | Assez riche | Riche  | Très riche |
| 20 à 30 TP/ch.                     | 100 %                                                                     |         |             |        |            |
| 30 à 50 TP/ch.                     | 66,6 %                                                                    | 26,6 %  | 6,8 %       |        |            |
| 50 à 70 TP/ch.                     | 23,0 %                                                                    | 56,4 %  | 15,3 %      | 5,3 %  |            |
| 70 à 90 TP/ch.                     | 13,3 %                                                                    | 57,2 %  | 24,7 %      | 4,8 %  |            |
| 90 à 120 TP/ch.                    | 7,3 %                                                                     | 39,0 %  | 42,2 %      | 11,5 % |            |
| 120 à 150 TP/ch.                   | 4,5 %                                                                     | 13,6 %  | 50,0 %      | 27,2 % | 4,7 %      |
| 150 à 200 TP/ch.                   |                                                                           | 16,7 %  | 16,7 %      | 50,0 % | 16,6 %     |

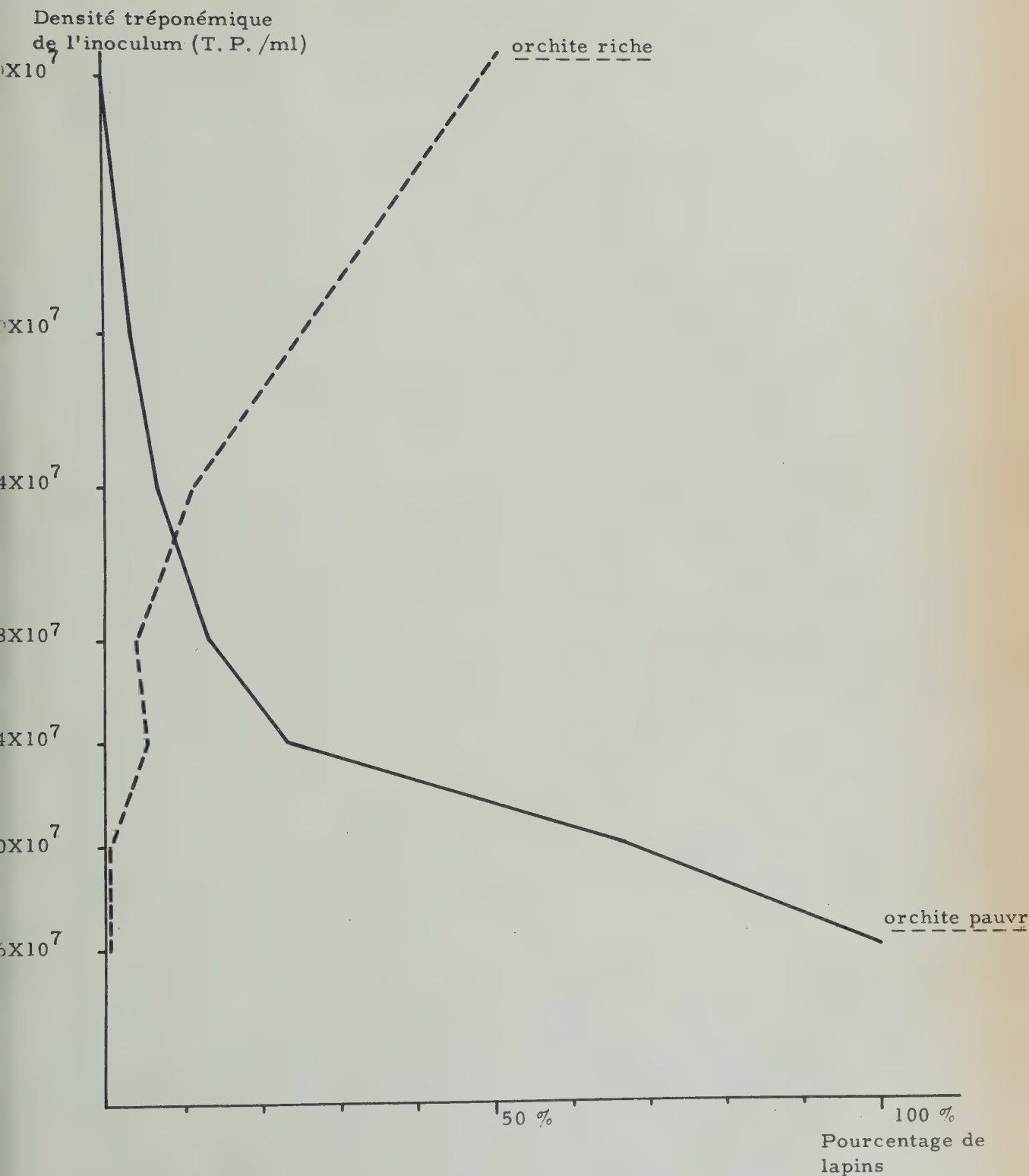
L'examen des Tableaux N° 2 et N° 3 montrent que les orchites pauvres en tréponèmes sont obtenues principalement avec des inoculums de faible densité tréponémique, les orchites riches au contraire, avec des inoculums à densité tréponémique élevée.

Ces résultats sont exprimés dans le graphique suivant N° II.

Nous remarquerons que NELSON (98) injectait 0,5 ml d'une suspension renfermant 5 à 10 X 10<sup>7</sup> tréponèmes par ml et observait l'apparition de l'orchite après un délai de 7 à 14 jours. Ce délai a été retrouvé dans nos travaux après inoculation de 1,0 ml d'une suspension présentant 20 à 30 tréponèmes par champ microscopique, soit 3 à 5 X 10<sup>7</sup> tréponèmes par ml.

En outre, la préparation de la suspension antigénique nécessitait une extraction des tréponèmes par agitation des testicules dans le milieu de survie pendant 2 heures, ce qui semble indiquer l'utilisation d'orchite pauvre par cet auteur.





GRAPHIQUE N° II : Variation de la richesse tréponémique de l'orchite en fonction de la densité tréponémique de l'inoculum.



b) Etat de l'animal d'expérience :

La race, l'alimentation et les conditions de vie du lapin inoculé peuvent influencer le devenir de l'orchite.

Race : Les nombreuses inoculations pratiquées nous ont montré que les orchites les plus riches en tréponèmes étaient obtenues avec des lapins présentant des testicules de volume important. Pour cette raison, plusieurs races semblent être à préférer :

- Bélier français
- Lapin russe
- Géant blanc russe
- Géant des Flandres
- Fauve de Bourgogne

Alimentation : L'alimentation des lapins comportera obligatoirement du grain (sarrasin ou avoine) dont l'action efficace sur le développement des fonctions génésiques chez le mâle est connue (138).

Température de l'animalerie : Selon NELSON (98), la température du clapier doit être maintenue entre 16° C et 18° C. Nos lapins ont été maintenus dans une pièce chauffée l'hiver et rafraîchie l'été par un système de courant d'eau : la température a varié en fait de 18° C à 25° C. Il nous semble qu'elle n'influence pas sensiblement le développement des orchites, un léger retard d'apparition a pu seulement être constaté quelque fois alors que la température était élevée.

Des lapins vaccinés contre la myxomatose, dans le mois précédant leur syphilisation, ont été inoculés sans que nous ayons remarqué de répercussions sur l'évolution de leur orchite.

c) Rôle du facteur de diffusion de Duran-Reynals :

Nous rappellerons que le facteur de Duran-Reynals, présent dans les extraits de divers organes et de nombreuses bactéries, favorise l'extension de l'infection par fluidification de la substance conjonctive fondamentale et qu'il appartient au groupe des hyaluronidases (31).

Le testicule est considéré comme constituant le milieu le plus riche en facteur de Duran-Reynals, cette richesse a peut-être un rapport avec le caractère aigu et précoce de l'orchite infectieuse provoquée.





A cet effet, nous avons essayé l'action d'une hyaluronidase d'origine testiculaire (bêlier), titrant 300 unités SCHWENK par milligramme. La hyaluronidase utilisée nous avait été fournie par Monsieur PAULY, Directeur des Laboratoires Sérobiologiques de PULNOY, que nous remercions ici. Ce produit a été ajouté à raison de 0,05 mg par ml d'inoculum (soit 15 unités SCHWENK par ml), qui a été injecté à la quantité de 1,0 ml par testicule.

Une accélération du développement de l'orchite syphilitique et une richesse en tréponèmes plus grande a pu être ainsi observée. L'influence de la hyaluronidase est notamment démonstrative lorsque, chez un même lapin, un seul testicule a été injecté par une suspension tréponémique additionnée de hyaluronidase et que l'autre a reçu un inoculum normal : l'apparition de l'orchite est notée un à deux jours plus tôt sur le premier testicule, après isolement, il montre une richesse en tréponèmes considérablement supérieure (double ou triple) à celle du testicule normalement inoculé.

Cependant l'utilisation de hyaluronidase peut entraîner une hydrocèle qui suit l'orchite, généralement deux jours après son installation. Il sera donc nécessaire d'utiliser très rapidement cette orchite après son apparition pour la pratique du test d'immobilisation.

### 3) Evolution unilatérale de l'orchite syphilitique :

L'orchite peut suivre une évolution différente dans chaque testicule d'un même lapin. Nous avons pu observer ainsi un testicule très riche en tréponèmes alors que l'autre en était dépourvu. On peut aussi noter une apparition plus rapide de l'orchite dans un testicule par rapport à l'autre. Ce phénomène ne semble pouvoir s'expliquer que par une inoculation de l'un des testicules pratiquée dans de mauvaises conditions.

En effet, en injectant dans chaque testicule d'un même lapin, des suspensions de densité tréponémique différente, nous avons pu constater un retard dans l'apparition de l'orchite et une richesse tréponémique moins grande avec le testicule ayant reçu l'inoculum le moins riche en tréponèmes.

L'utilisation, dans cette expérience, de quantités différentes d'inoculum pour chaque testicule ne nous a pas paru souhaitable car elle peut modifier les réactions tissulaires du lapin. L'injection d'une quantité supérieure à 1,0 ml dans un testicule (1,5 à 2,0 ml) a souvent provoqué une hydrocèle.



#### 4) Conservation des tréponèmes par le froid :

Pour permettre une pratique plus facile du T. I. T. , certains auteurs ont proposé la conservation des tréponèmes par le froid.

On sait que les tréponèmes, comme de nombreux autres spirochètes, sont susceptibles d'être conservés à une température de - 60°C et de retrouver ensuite leur vitalité à + 35°C (162). Cette propriété permet une conservation de la souche plus simple et plus sûre que les passages successifs sur lapin. GASTINEL et ses collaborateurs (50) ont étudié l'influence des températures de congélation ( $t^{\circ}$  maxima : - 20°C) et des températures de conservation ( $t^{\circ}$  maxima : - 20°C) sur la viabilité des tréponèmes.

Nous avons obtenu de bons résultats en pratiquant une congélation de testicules riches en tréponèmes au moyen d'un mélange de neige carbonique et d'acétone (température voisine de - 80°C) et en conservant ce matériel au sein de la neige carbonique (température voisine de - 60°C), la décongélation était effectuée brutalement au bain-marie à + 35°C.

##### a) Utilisation de tréponèmes conservés par le froid pour l'inoculation de lapins :

Dans nos essais, des lapins ont été inoculés au moyen de tréponèmes conservés par le froid, selon les conditions indiquées. Nous avons constaté un allongement assez notable du délai d'apparition de l'orchite, malgré l'utilisation d'inoculum à densité tréponémique élevée. Le retard observé est de 25 à 50 %, et dans un cas de 100 %. En outre, les orchites ainsi obtenues présentaient généralement une richesse tréponémique pauvre ou moyenne. On peut penser qu'une partie des tréponèmes a été lésée par le froid, une mobilité ralentie est d'ailleurs constatée à l'ultra-microscope pour un certain nombre de tréponèmes venant de subir la décongélation après conservation par le froid. Il y aurait donc une très légère atténuation de leur virulence pour le lapin. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons réalisé un second passage sur lapin avant d'utiliser les tréponèmes ainsi entretenus pour la pratique d'une série de T. I. T.

##### b) Utilisation de tréponèmes conservés par le froid pour la préparation de la suspension antigénique du T. I. T. :

L'emploi direct de tréponèmes conservés par le froid pour la préparation de la suspension antigénique du T. I. T. apparaît peu souhaitable a priori. Ce procédé a pourtant été proposé par CHORPENNING,





SANDERS et KENT (20), ainsi que par ANDERSON (1), CHORPENNING constatait une survie moyenne de 87 % des tréponèmes ainsi conservés après 18 heures de séjour en anaérobiose, et une reproductibilité des résultats trouvés en utilisant des suspensions antigéniques préparées avec des testicules syphilités frais.

Les conclusions de nos essais nous ont fait rejeter cette méthode. En effet, pour 5 séries de tests pratiquées au moyen de suspensions de tréponèmes provenant de testicules congelés, 4 montrèrent une survie trop faible pour permettre l'expression de résultats et une se trouva à la limite de l'utilisation. Les différents pourcentages de mobilité des tréponèmes observés après un séjour de 22 heures dans le milieu de survie en anaérobiose sont indiqués dans le tableau suivant n° 4.

TABLEAU N° 4 - Pourcentages de mobilité de tréponèmes, conservés par le froid, après un séjour de 22 heures en anaérobiose, dans le milieu de survie et à + 35°C.

|                                        | 1° série | 2° série | 3° série | 4° série | 5° série |
|----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| dans la suspension seule               | 48 %     | 66 %     | 60 %     | 20 %     | 28 %     |
| dans la suspension + 10 % sérum humain | 54 %     | 79 %     | 66 %     | 39 %     | 46 %     |
| + 30 % sérum cobaye                    |          |          |          |          |          |

On note donc une survie nettement insuffisante, l'influence favorable du sérum sanguin ne permet cependant qu'à une seule série (2<sup>e</sup> série) d'être utilisable dans un T. I. T.

Ce défaut de survie peut être expliqué par le passage dans les suspensions d'une grande quantité de suc testiculaire renfermant des composés anormaux à caractère tréponémicide, provenant de la lésion des tissus testiculaires lors de la congélation et de la décongélation.

Pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse, nous avons préparé une lère suspension à partir d'un testicule décongelé et lavé soi-





gneusement à l'eau physiologique, et une 2ème suspension à partir d'un deuxième testicule provenant de la même orchite, mais non lavé. La suspension renfermant du suc testiculaire a montré une survie inférieure (36%) à celle obtenue avec la suspension dépourvue de suc testiculaire (60%), mais dans les deux cas, la survie était mauvaise. Il faut toutefois remarquer qu'il est impossible d'empêcher totalement le passage de suc testiculaire dans la suspension lorsque les testicules ont été décongelés et lavés le plus soigneusement possible.

L'adjonction de glycérine aux testicules, lors de la congélation ne modifie pas ces résultats.

Si la conservation par le froid des tréponèmes n'est pas favorable à une bonne exécution du T. I. T., elle permet cependant la constitution d'une réserve de sécurité, utilisable éventuellement pour l'inoculation d'animaux neufs.

#### 5) Technique de l'inoculation :

Les tréponèmes sont donc entretenus par passages successifs de lapin à lapin en ayant recours à l'inoculation intra-testiculaire qui conduit à l'apparition précoce d'une orchite aigue de richesse tréponémique élevée.

#### a) Préparation de l'inoculum :

La technique est très voisine de celle utilisée pour la préparation de la suspension antigénique qui sert à l'exécution du T. I. T. :

2

testicules riches en tréponèmes, provenant d'un lapin syphilité, sont déchiquetés après avoir été isolés, ils sont ensuite soumis à une extraction au moyen du mélange suivant :

|                   |        |
|-------------------|--------|
| eau physiologique | 3,0 ml |
| milieu de survie  | 3,0 ml |

l'entraînement des spirochètes dans ce mélange est effectué dans une fiole de Sausse en atmosphère anaérobie, au moyen du mélange gazeux d'azote (95%) et de gaz carbonique (5%), (voir plus loin, la préparation de la suspension antigénique du T. I. T.), il est favorisé par une agitation de 30 à 60 minutes à l'aide d'un agitateur de KAHN, la suspension centrifugée durant 5 minutes à la vitesse de 1200 t/m, et décantée ensuite, doit présenter à l'ultra-microscope une densité tréponémique voisine de 100 germes par champ microscopique.



Les testicules utilisés pour cette opération peuvent être :

- soit des testicules déjà semi-épuisés pour la préparation d'une suspension antigénique, ils sont alors remis en anaérobiose dans le mélange indiqué, aussitôt après le premier épuisement;
- soit des testicules "neufs", prélevés chez un lapin dont l'inoculation ne remonte pas à plus de 20 jours,
- soit des testicules conservés à la température de  $-60^{\circ}\text{C}$  au sein de la neige carbonique dans un conservateur thermique, dans ce dernier cas, les testicules riches en tréponèmes avaient été soumis à une congélation rapide au moyen du mélange de neige carbonique et d'alcool et décongelés au moment de leur emploi à  $+35^{\circ}\text{C}$  au bain-marie.

b) Inoculation des animaux :

Les lapins, utilisés pour la conservation de la souche de tréponèmes, doivent être âgés de plus de 6 mois, avoir un poids supérieur à 2 kg, 500 et posséder des testicules volumineux (4,5 à 5,0 cm de long, et 1,5 à 2,0 cm de diamètre), ils doivent avoir reçu, depuis 15 jours au moins, une nourriture totalement dépourvue d'antibiotiques.

Les animaux sont maintenus en hyper extension forcée verticale, l'opérateur serre fortement d'une main, le cordon scrotal au dessus du testicule, pour empêcher sa remontée et, de l'autre main, enfonce l'aiguille montée sur la seringue contenant l'inoculum, en la dirigeant de haut en bas et légèrement oblique par rapport au grand axe du testicule, de manière à éviter l'épididyme. La pointe de l'aiguille doit se trouver au centre géométrique du testicule.

1,0 à 1,5 ml de suspension tréponémique sont injectés lentement en évitant le passage d'air. Après l'injection, on doit noter une sensation de tension du testicule et non de fluctuation qui indiquerait une injection dans la vaginale, s'accompagnant généralement d'un rejet de suspension par l'orifice de la pique, lorsqu'une pression est exercée sur le testicule, l'injection est alors inefficace.

Les lapins inoculés sont placés dans une animalerie dont la température est maintenue entre  $16^{\circ}\text{C}$  et  $20^{\circ}\text{C}$ .



CHAPITRE II  
=====

SURVIE DES TREPONEMES  
=====





## CHAPITRE II

### SURVIE DES TREPONEMES

Nous avons indiqué que c'est la réalisation d'un milieu capable d'assurer la survie de *Treponema pallidum* durant un temps suffisamment long qui permit à NELSON et MAYER de mettre au point la technique de la réaction d'immobilisation des tréponèmes.

En effet, l'immobilisation des tréponèmes par les immobilisines nécessite un contact prolongé, d'au moins 18 heures, entre les spirochètes et le sérum renfermant les anticorps immobilisants. Un milieu propre à maintenir *Treponema pallidum* vivant pendant 24 heures au moins est donc indispensable pour une bonne exécution du T. I. T.

#### 1) Milieu de NELSON et MAYER :

Le milieu préparé par NELSON et MAYER (98) était constitué :

- d'albumine de boeuf,
- de composés réducteurs organiques (Thioglycolate de sodium, Cysteine, Glutathion)
- de Pyruvate de sodium,
- de sels minéraux (Chlorure de sodium, Phosphate monopotassique, Phosphate disodique et Bicarbonate de sodium constituant un système tampon),
- et de l'association de 9 vitamines appartenant au groupe B).

Nous rappelons la composition de ce milieu.

#### a) Composition du milieu de NELSON et MAYER :

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Albumine bovine cristallisée | 23 500 mg |
| Chlorure de sodium           | 6 172 mg  |
| Bicarbonate de sodium        | 712 mg    |
| Phosphate monopotassique     | 1 068 mg  |



|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| Phosphate disodique          | 1 710 mg          |
| Thioglycolate de sodium      | 160 mg            |
| L (+) cysteine, chlorhydrate | 185 mg            |
| Glutathion                   | 360 mg            |
| Pyruvate de sodium           | 145 mg            |
| Thiamine, chlorhydrate       | 1 mg              |
| Niacine                      | 1 mg              |
| Panthothenate de calcium     | 0,5 mg            |
| Pyridoxine                   | 0,5 mg            |
| Riboflavine                  | 0,5 mg            |
| Choline, chlorhydrate        | 0,5 mg            |
| Inositol                     | 0,5 mg            |
| Biotine                      | 0,01 mg           |
| Acide folique                | 0,01 mg           |
| Eau bidistillée              | q. s. p. 1 000 ml |

b) Constituants du Milieu de NELSON et MAYER :

Sels minéraux : Le chlorure de sodium est nécessaire, son remplacement par le chlorure d'ammonium diminue le temps de la survie qui est complètement annihilée par le chlorure de potassium.

Les phosphates qui constituent avec le bicarbonate un système tampon, ont, de plus, une action directe sur la survie des tréponèmes, car leur remplacement par un autre système tampon non toxique diminue considérablement la survie (173).

Vitamines : L'association des 9 vitamines du groupe B, non indispensables à la survie a été abandonnée dans un but de simplification. Il semble que le suc testiculaire passant dans le milieu de survie, lors de l'extraction des tréponèmes, compense leur absence (173).

Composés réducteurs : Le rôle néfaste de l'oxygène sur la survie du tréponème avait conduit NELSON à faire entrer des substances réductrices dans la composition du milieu pour renforcer l'anaérobiose. L'action des composés retenus n'est cependant pas due à leur seule activité anti-oxygène.

REY et NIELSEN (134) avaient remarqué que, si l'élévation progressive de la concentration en thioglycolate augmentait le pourcentage de survie en atmosphère renfermant des traces d'oxygène, il en était de même après suppression de l'oxygène. Ils émirent l'hypothèse d'une action du thioglycolate dans le métabolisme de *Treponema pallidum*. L'in-



fluence favorable des composés soufrés sur le développement in vitro du tréponème de REITER avait été signalée par EAGLE et STEINMANN en 1948 (35).

Plus tard, WEBER (173) a établi que seules les substances réductrices organiques comportant le groupement sulfhydrique SH libre ont une action utile et indispensable à la survie de *Treponema pallidum* (Thioglycolate, cysteine, glutathion, mercaptosuccinate, homocystéine...), par contre, les composés renfermant le groupement SH sous forme oxydée n'ont aucune action sur la survie (cf cystine mercaptoéthanol, mercaptoéthylamine...). En outre, la présence d'un groupement carboxylique COOH dans la formule des composés sulfhydriques inhibe leur effet sur la survie des tréponèmes.

Il semble donc que le thioglycolate, la cystéine et le glutathion utilisés dans le milieu de survie, agissent directement sur le métabolisme des tréponèmes et que cette action est en rapport avec la présence d'un groupement SH dans leur constitution.

La concentration en thioglycolate préconisée par NELSON était de 0,016 g %. Elle fut quadruplée par NIELSEN et REYN. Une concentration de 0,050 g pour 100 ml employée dans nos essais a donné des résultats satisfaisants : nous avons utilisé 4 lots différents de Thioglycolate de sodium (Prolabo) pour la préparation de 24 milieux.

Il faut remarquer que la teneur en SH actif du thioglycolate varie d'un lot à l'autre et qu'il est difficile de comparer les résultats des différents laboratoires en toute objectivité, il semble donc préférable d'utiliser une dose excédentaire de thioglycolate, en signalant que cette substance possède un pouvoir anticomplémentaire (63) qu'il est nécessaire de compenser en augmentant la quantité de complément utilisé dans le T. I. T.

Enfin, le pyruvate de sodium a également une action très nette sur l'augmentation de la survie des tréponèmes, et n'a pu être remplacé par des substances voisines réductrices ou non (173).

Albumine : L'albumine bovine desséchée utilisée dans nos essais, était fournie par la firme Poviet (Amsterdam) 5 lots différents ont permis la préparation de 24 milieux. Il s'agissait d'albumine préparée pour la culture du bacille de KOCH en milieu de DUBOS. Son emploi a été recommandé par les laboratoires du T. I. T. de l'Hôpital Saint-Louis de PARIS, de l'Hôpital Saint-Lazare de PARIS et d'UTRECHT (Hollande) (105).





Le remplacement de l'albumine par la fraction V du plasma bovin a été proposé par NELSON et DIESENDRUCK (97), les deux substances sont indifféremment utilisées par SAUSSE (149) et DUREL (32). L'albumine entière de la firme Armour de CHICAGO a été préférée par HAMELIN (54).

L'albumine humaine et sa fraction V, de prix de revient inférieur, ont été également préconisées (54) (155).

La gélatine, utilisée à la dose de 0,4 g pour 100 ml, a été aussi proposée à la place de l'albumine dans un but d'économie par le laboratoire du Test de NELSON de la Columbia University (U. S. A.) (108).

Enfin, BERLINGHOFF a substitué à l'albumine le polyvinylpyrrolidone (8).

## 2) Milieu de NELSON additionné de diverses substances :

De nombreuses formules de milieu de survie pour *Treponema pallidum* ont été proposées pour la pratique du T. I. T.

Certains auteurs ont légèrement modifié la composition du milieu proposé par NELSON en lui ajoutant quelques composés jugés intéressants.

Magnésium : Cet élément est introduit sous forme de  $MgCl_2$ , 60 H<sub>2</sub> à raison de 200 à 400 mg pour 100 ml de milieu, ou sous forme de  $MgSO_4$ , 70 H<sub>2</sub> à raison de 25 à 50 mg pour 100 ml, par KIMM (65), il prolongerait notablement la survie des tréponèmes.

Calcium : Le calcium utilisé sous forme de  $CaCl_2$ , 20 H<sub>2</sub> à raison de 200 mg pour 100 ml de milieu par CHORPENNING est sans action sur la survie des tréponèmes, mais, par contre augmenterait la sensibilité du test en intensifiant l'action des anticorps immobilisants.

Succinate : LORENZO (80) fait entrer le succinate de sodium au taux de 60 mg pour 100 ml dans un milieu de NELSON modifié et ne comprenant plus les composés réducteurs sulfhydriques. Il obtient ainsi des résultats de survie identiques.

Glucose : Le glucose prolongerait et élèverait la survie des tréponèmes à la concentration optima de 100 à 200 mg pour 100 ml de milieu selon KIMM (65). Il entre également dans la composition du milieu de MARGNI (85).





Héparine : L'héparine est utilisée par le V.D.R.L. de LONDRES (110) pour empêcher la coagulation du mélange milieu-sérum pendant le test. Nous n'avons jamais observé ce fait au cours des essais que nous avons pratiqués.

Dihydrostreptomycine : Cet antibiotique est dépourvu d'activité tréponémicide (93). Son adjonction au milieu de survie permet de combattre les contaminations possibles lors de la manipulation et l'examen de sérums parvenus non stériles au laboratoire. A la dose de 100 mg pour 100 ml, la dihydrostreptomycine (sulfate) ne modifie pas la survie du tréponème et n'a pas d'influence sur l'activité du complément (18) (40) (75). Selon FEGLER (41), cet antibiotique posséderait même une action légèrement stimulante sur la vitalité de *Treponema pallidum*.

Ultra-filtrat de sérum de boeuf : L'addition d'ultra-filtrat de sérum de boeuf a permis à RICE et NELSON (136) d'observer une amélioration de la survie des tréponèmes, ils isolèrent dans l'ultra-filtrat un facteur de survie soluble dans les solvants organiques ("treponemal survival factor").

Cependant HAMELIN (54) a conclu à l'inutilité de l'ultra-filtrat en présence de suc testiculaire dans le milieu.

Au cours de nos essais, il nous a paru intéressant d'étudier le rôle de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf additionné au milieu de survie en pratiquant les expériences suivantes :

a) Des suspensions tréponémiques pauvres en suc testiculaire furent réalisées au moyen de testicules lavés préalablement à l'aide d'eau physiologique glacée afin d'en éliminer au maximum les sucs contenus, et au moyen :

- de 4 lots de milieu répondant à la composition indiquée qui a été adoptée pour la pratique du T.I.T. dans notre travail, avec comme seule modification la suppression de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf,

- de 4 mêmes lots additionnés d'ultra-filtrat de sérum de boeuf (Institut Pasteur) à la dose de 6 ml pour 100 ml.

Nous avons déterminé le pourcentage de survie des tréponèmes, après un séjour de 22 heures en atmosphère anaérobie (Azote 95 % et Gaz carbonique 5 %).

- dans ces 8 milieux de survie utilisés seuls,

- dans ces 8 milieux additionnés de sérum humain dépourvu d'anticorps immobilisants, ajouté dans la proportion de 10 %,



- dans ces 8 milieux additionnés de sérum humain (10%), et de complément, sérum frais et pur de cobaye ajouté dans la proportion de 30 %, afin de se trouver dans les conditions habituelles d'exécution du T. I. T. , le sérum humain et le complément étant ajoutés aux doses utilisées dans la pratique du T. I. T. permettent de juger l'intervention de l'ultra-filtrat lors de la réalisation d'un test.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant N° 5.

TABLEAU N° 5 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes après 22 heures de séjour en anaérobiose, dans différents lots du milieu de survie avec ou sans ultra-filtrat de sérum de boeuf :

|                                                               | LOT 1   |         | LOT 2   |         | LOT 3   |         | LOT 4   |         |
|---------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                                               | Sans UF | Avec UF | Sans UF | Avec UF | Sans UF | Avec UF | Sans UF | Avec UF |
| Suspension tréponémique                                       | 40      | 96      | 34      | 90      | 30      | 60      | 82      | 98      |
| Suspension tréponémique + sérum humain (10 %)                 | 90      | 96      | 90      | 90      | 74      | 80      | 96      | 98      |
| Suspension tréponémique + sérum humain 10% + complément (30%) | 96      | 98      | 98      | 96      | 80      | 88      | 98      | 98      |

UF : Ultra-filtrat de sérum de boeuf

b) Les mêmes essais ont été répétés avec des suspensions tréponémiques riches en suc testiculaire, le lapin était saigné à blanc pour débarrasser les testicules de sang avant leur prélèvement et préparer la suspension de tréponèmes sans leur faire subir un lavage préalable. En outre 2 testicules d'un lapin sain étaient encore ajoutés au milieu de survie pendant l'extraction des tréponèmes : la suspension tréponémique se trouvait ainsi



2 fois plus riche en suc testiculaire.

Les résultats ainsi obtenus sont groupés dans le tableau suivant N° 6.

TABLEAU N° 6 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes après 22 heures de séjour en anaérobiose, dans 2 milieux de survie riches en suc testiculaire, avec ou sans ultra-filtrat de sérum de boeuf.

|                                                                         | LOT 1   |         | LOT 2   |         |
|-------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                                                         | Sans UF | Avec UF | Sans UF | Avec UF |
| Suspension tréponémique                                                 | 78      | 88      | 84      | 96      |
| Suspension tréponémique<br>+ sérum humain (10 %)                        | 86      | 86      | 90      | 98      |
| Suspension tréponémique<br>+ sérum humain (10 %)<br>+ complément (30 %) | 92      | 94      | 98      | 98      |

L'examen de ces tableaux N° 5 et N° 6 montre que :

1° - l'ultra-filtrat de sérum de boeuf a une influence favorable sur la survie des tréponèmes (Tableau n° 5 : la survie est doublée dans 3 cas sur 4 par l'addition d'ultra-filtrat).

2° - l'absence de l'ultra-filtrat est compensée par la présence de sérum sanguin (homme et cobaye), utilisés aux doses du T. I. T. (Tableau n° 5).

3° - le suc testiculaire ne pallie que légèrement l'absence de d'ultra-filtrat (Tableau n° 6).

Pratiquement, l'ultra-filtrat de sérum de boeuf apparait donc comme une substance non indispensable à la réalisation du milieu de survie pour le T. I. T. , puisqu'il peut être suppléé par la quantité de complément ajouté lors de l'exécution du T. I. T.







Son action favorable constitue cependant une sécurité supplémentaire et permet d'obtenir une survie satisfaisante dans la suspension antigénique sans intervention du complément ni du sérum humain.

Enfin, nous avons essayé l'utilisation d'ultra-filtrat de sérum de cheval, pour remplacer l'ultra-filtrat de sérum de boeuf, de moins bons résultats de survie des tréponèmes ont été obtenus (60 à 80 %), mais nous n'avons étudié que des échantillons provenant d'un même lot de l'Institut Pasteur. Il n'est donc pas possible d'affirmer si ces résultats sont le fait d'un défaut de fabrication du lot examiné, ou d'une propriété normale du sérum de cheval. Une même constatation a cependant été faite par le Laboratoire du Test de NELSON de l'Hôpital Saint-Louis de PARIS (communication personnelle).

Milieu de WEBER : Le milieu de WEBER (173) est un milieu de NELSON très complété. Il constitue le meilleur milieu de survie actuel de *Treponema pallidum* (50 % de survie après 16 jours), il contient tous les éléments du milieu original de NELSON (y compris l'association vitaminique) et en plus de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf, et 10 composés supplémentaires (citrate de sodium, L tyrosine, DL tryptophane, hydrolysate acide de gélatine, chlorure de calcium, disulfonate d'Indigo, acide paraaminobenzofque, putrescine, vitamine B 12, nicotamide).

L'inconvénient majeur de ce milieu est sa préparation longue et coûteuse; son intérêt essentiel réside dans l'obtention d'une survie prolongée mais qui n'intervient pas dans la pratique courante du T. I. T.

Composition du Milieu de WEBER : pour 100 ml de milieu on a :

|                                                            | <u>mg/100 ml</u> | <u>ml/100 ml</u> | <u>µg/100 ml</u> |
|------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Fraction V albumine bovine                                 | 2000             |                  |                  |
| Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> , 12 OH <sub>2</sub>     | 400              |                  |                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | 50               |                  |                  |
| NaCl                                                       | 850              |                  |                  |
| Na citrate, 2 OH <sub>2</sub>                              | 100              |                  |                  |
| L tyrosine                                                 | 10               |                  |                  |
| DL tryptophane                                             | 4                |                  |                  |
| Hydrolysate acide de gélatine                              | 400              |                  |                  |
| Ca <sup>++</sup> (Ca Cl <sub>2</sub> , 2 OH <sub>2</sub> ) |                  |                  | 150              |
| Na pyruvate                                                | 25               |                  |                  |
| Glutathion                                                 | 60               |                  |                  |
| L (+) cysteine                                             | 20               |                  |                  |
| Na thioglycolate                                           | 50               |                  |                  |
| Indigo disulfonate                                         | 2                |                  |                  |



|                                 | <u>mg/100 ml</u> | <u>ml/100 ml</u> | <u>µg/100 ml</u> |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ultra-filtrat de sérum de boeuf |                  | 10,0             |                  |
| Thiamine, HCl                   |                  |                  | 250              |
| Acide nicotinique               |                  |                  | 500              |
| Ca panthothénate                |                  |                  | 250              |
| Riboflavine                     |                  |                  | 50               |
| Pyridoxine, HCl                 |                  |                  | 100              |
| Pyridoxamine, 2 HCl             |                  |                  | 100              |
| Acide para amino benzoïque      |                  |                  | 50               |
| Biotine                         |                  |                  | 1                |
| Choline, HCl                    |                  | 0,005            |                  |
| Inositol                        |                  | 0,005            |                  |
| Acide folique                   |                  |                  | 1                |
| Putrescine, 2 HCl               |                  |                  | 250              |
| Vitamine B 12                   |                  |                  | 0,1              |
| Nicotinamide                    |                  |                  | 250              |

pH du milieu de survie : Le pH indiqué par NELSON et MAYER (98) était de 7,0, et il a été adopté par presque tous les laboratoires. Les mesures de pH, dans nos essais, étaient faites à 0,01 près. Comme nous l'avons signalé (84), le pH du milieu peut varier de 6,90 à 7,10 sans affecter la survie des tréponèmes. EHRMANN et RAAB (37) emploient un milieu de survie amené à pH 7,20 et FUCHS et ARHENS (46) un milieu amené à pH 7,30, ces auteurs obtiennent ainsi des résultats de survie satisfaisants.

### 3) Milieux biologiques :

Différents auteurs ont mis au point des milieux de survie d'origine biologique pour *Treponema pallidum*.

Ces milieux sont généralement semi-synthétiques, c'est-à-dire à base de liquide biologique additionné de composés définis. Cependant, les sérums sanguins de diverses espèces animales ont été quelquefois préconisés sans adjonction d'aucune autre substance.

a) Milieux à base de sérum sanguin : L'action efficace de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf sur la survie des tréponèmes et l'isolement du "treponemal survival factor" par RICE et NELSON (136) ont conduit à l'essai de divers sérums animaux comme milieux de survie pour *Treponema pallidum*.

Le sérum de lapin est le plus souvent utilisé. RANQUE, MOIGNOUX et DEPIEDS ont comparé la survie des tréponèmes dans le



sérum de lapin et dans les sérums de mouton, de boeuf et d'homme (125). Le sérum de lapin leur est ainsi apparu comme étant le plus apte à assurer cette survie, ce fait pouvant être en rapport avec la réceptivité de l'animal pour la syphilis et avec la conservation de la souche NICHOLS sur le lapin depuis 1912. Le milieu préconisé par ces auteurs pour l'exécution du T. I. T. est composé à parties égales d'eau physiologique et de sérum de lapin. Il est à noter que le sérum de lapin inactivé fournit une moins bonne survie que le sérum frais dans cet emploi : 85 % à la 24 ème heure au lieu de 98 %.

L'emploi de sérum de lapin inactivé et pur a été proposé par BOAK et MILLER (12), ainsi que par le laboratoire du T. I. T. de HAM-BOURG (104). Les résultats obtenus se révèlent identiques à ceux fournis en opérant avec le milieu de NELSON.

Le sérum de lapin trouve encore son utilisation au laboratoire du T. I. T. d'UTRECHT, en remplacement de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf ajouté au milieu de NELSON (107).

Nous avons essayé l'utilisation de sérum de lapin comme milieu de survie, en comparant la valeur d'un sérum de lapin et celui d'une lapine vierge.

Le sang fut prélevé stérilement par ponction cardiaque. Le sérum était utilisé sans filtration préalable. Deux testicules riches en tréponèmes, provenant d'un lapin ayant montré une orchite bilatérale étaient soumis chacun à une extraction :

le 1<sup>er</sup> testicule au moyen de sérum de lapin,

le 2<sup>ème</sup> testicule avec du milieu de survie répondant à la composition indiquée qui a été adoptée pour la pratique du T. I. T. dans nos essais.

Les mêmes échantillons de sérums étaient testés parallèlement avec les 2 suspensions antigéniques obtenues.

Les pourcentages de mobilité des tréponèmes déterminés dans ces différentes suspensions, additionnées ou non de complément (sérum de cobaye frais et pur), ajouté à la dose utilisée dans le T. I. T. , sont rassemblés dans le tableau suivant N° 7.





TABLEAU N° 7 - Pourcentages de mobilité des tréponèmes après 22 heures de séjour en anaérobiose, dans les différents milieux de survie : sérum de lapin et de lapine, milieu classique.

|                                                                | Suspension tréponémique<br>0,50 ml | Suspension tréponémique<br>0,35 ml<br>+ complément 0,15 ml |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Milieu de survie classique                                     | 94 %                               | 98 %                                                       |
| Sérum de lapin                                                 | 78 %                               | 82 %                                                       |
| Sérum de lapine vierge, pur                                    | 84 %                               | 84 %                                                       |
| Sérum de lapin )<br>+ eau physiolo- )aa<br>gique )             | 82 %                               | 88 %                                                       |
| Sérum de lapine )<br>vierge ) aa<br>+ eau physiolo- )<br>gique | 86 %                               | 90 %                                                       |

Les sérums utilisés étaient préalablement inactivés par un chauffage de 30 minutes à 56°C.

L'examen du Tableau N° 7 montre que le sérum de lapin fait preuve d'une efficacité inférieure à celle du milieu de survie, et que la survie est légèrement augmentée dans le sérum de lapin dilué au 1/2. et que le sérum de lapine vierge donne un pourcentage de survie légèrement supérieur.

D'autre part, au cours de nos essais, nous avons observé que :

- le sérum de lapin, examiné par le test d'immobilisation des tréponèmes, à la dose normale de 0,05 ml de sérum de lapin pour 0,35 ml de suspension tréponémique et de 0,15 ml de complément, donne très souvent des résultats peu satisfaisants, une immobilisation partielle dans le tube à réaction (complément actif) et dans le tube témoin (complément inactivé), est observée, indiquant la présence de traces tréponémicides dans le sérum de lapin,

- le sérum de lapin sain, soumis à la sérologie classique et au





T. I. T. , fournit souvent de faibles immobilisations spécifiques et des réactions d'hémolyse et de floculation partiellement positives, ces résultats pourraient être en rapport avec une infection à *Treponema cuniculi* du lapin qui développe également des réagines et des immobilisines dans ce cas,

- le sérum de lapin peut présenter un pouvoir anticomplémentaire élevé, ces trois observations nous ont fait rejeter l'emploi de sérum de lapin comme milieu de survie pour *Treponema pallidum* lors de l'exécution du T. I. T.

a) Le sérum de cobaye : entre dans la composition du milieu de MARGNI (85) additionné d'hématine, de glucose et de cysteine. La valeur de ce milieu n'a pas encore été étudiée par d'autres auteurs.

b) Les sérums de boeuf et de mouton : ont été essayés par RANQUE, MOIGNOUX et DEPIEDS (125). Les résultats qu'ils ont obtenus, n'ont pas été jugés satisfaisants, surtout en ce qui concerne le sérum de boeuf, cet animal est, par ailleurs, réfractaire à la syphilis.

Sérum de mouton inactivé : 63 % de tréponèmes mobiles après 18 heures de séjour en anaérobiose,

Sérum de boeuf inactivé : 40 % de tréponèmes mobiles après 18 heures de séjour en anaérobiose.

Nous avons effectué des T. I. T. sur du sérum de mouton. Ce sérum ne s'est pas révélé tréponémicide et n'a pas modifié la survie à la dose de 0,05 ml de sérum de mouton pour 0,15 ml de complément et de 0,35 ml de suspension tréponémique.

c) le sérum humain : qui a également fait l'objet de recherches de RANQUE et de ses collaborateurs (125) n'a pas été retenu. Il fournit :

82 % de mobilité des tréponèmes après 18 heures de séjour en anaérobiose, et 77 % après 24 heures.

BELLONE et BONELLI (7), après avoir obtenu des résultats différents, ont conclu à son utilisation possible. Ces derniers auteurs observent après 42 heures, une survie de 91 % des tréponèmes dans le sérum humain inactivé. L'examen comparatif de 120 prélèvements réalisés avec des suspensions tréponémiques en sérum humain et en milieu classique de NELSON a montré une concordance dans 96 % des cas.

Cette utilisation ne nous paraît cependant pas souhaitable car :



- le sérum humain peut contenir des immobilisines naturelles qui abaisseront la survie en présence de complément dans les tubes à réaction,

- l'emploi de différents sérums à chaque renouvellement de lot, soumet la technique du T. I. T. à une importante variation et nous semble nécessiter des contrôles préalables consistant en la détermination de l'absence de pouvoir tréponémicide et du pouvoir anticomplémentaire éventuel du sérum.

Enfin, il est à signaler que les concentrations sériques élevées de la suspension tréponémique (cas de tous les milieux sériques décrits) diminuent la transparence et rendent donc la lecture du test plus difficile au microscope à fond noir.

b) Milieux divers à base d'autres liquides biologiques :

Les autres liquides biologiques, utilisés dans la composition de milieu de survie pour *Treponema pallidum*, sont des extraits embryonnaires, des liquides amniotiques et des extraits d'yeux.

Milieux à base d'extrait d'embryon :

DELACRETAZ (28) a proposé un milieu qui est préparé extemporanément avant l'exécution d'une série de T. I. T. , en mélangeant dans les proportions suivantes :

- 5 % d'extrait embryonnaire de souris
- 10 % de sérum humain ou ovin
- 85 % de liquide de Tyrode.

L'extrait embryonnaire est préparé en immergeant, dans du liquide Tyrode, des embryons hachés qui ont été extraits stérilement de l'utérus de souris, le 18 ème ou le 19 ème jour de la gestation, on utilise 1 ml de liquide de Tyrode par embryon. L'extrait se conserve à + 5°C pendant une à deux semaines.

Ce milieu qui est utilisé par l'auteur au laboratoire du T. I. T. de LAUZANNE, donne une survie identique à celle obtenue avec le milieu de NELSON, mais les sérums positifs donnent des titres plus élevés en milieu à l'extrait embryonnaire de souris qui semble donc augmenter la sensibilité de la réaction.

Un milieu à base d'extrait d'embryon de rate a été proposé par RESTA et ses collaborateurs (133). Il est préparé de la même manière.



Il faut noter, dans ces milieux à l'extrait embryonnaire, la présence de magnésium ( $MgCl_2$ ) et de glucose apportés par le liquide de Tyrode. Les résultats obtenus dans ces conditions confirment donc l'influence favorable de ces éléments. On remarque également dans leur composition, la présence de sérum sanguin qui apporte la presque totalité de la fraction proteique du milieu et dont nous avons signalé l'importance dans la survie des tréponèmes.

Milieu à base de liquide amniotique :

Un milieu essentiellement constitué par du liquide amniotique de vache (92,8 %), additionné de thioglycolate, pyruvate, cysteine et glytathion, a été réalisé par VINCENT (169). Il donne 88 à 92 % de survie après 24 heures et se conserve 6 mois.

L'action favorable du liquide amniotique sur la survie des tréponèmes est à rapprocher de l'efficacité des extraits embryonnaires. Cependant, ces résultats doivent être confrontés avec ceux obtenus par RIVASSEAU-COUTANT (137), lors de ses recherches expérimentales sur la syphilis congénitale du lapin. Dans le but d'expliquer l'impossibilité de syphilisation "in utero" des lapins par *Treponema pallidum*, cet auteur a recherché la présence, dans l'embryon, d'un facteur de survie inhibant la vitalité des tréponèmes. Il a été ainsi conduit à étudier la survie des tréponèmes dans les extraits de fœtus et de placenta et dans le liquide amniotique de lapine, de brebis et de vache. Une légère diminution de la survie des tréponèmes fut observée avec des liquides amniotiques de lapine et de brebis prélevés en fin de gestation. Les résultats obtenus avec le liquide amniotique de vache furent moins constants, comme on le voit dans le tableau suivant :

Pourcentage de mobilité des tréponèmes dans les milieux de survie à base de liquide amniotique après un séjour de 18 heures en anaérobiose (RIVASSEAU-COUTANT) :

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| Milieu de NELSON ) aa             | 96 % |
| Eau physiologique )               |      |
| Milieu de NELSON )                |      |
| Liquide amniotique de ) aa        | 72 % |
| lapine (25 <sup>e</sup> jour de ) |      |
| gestation)                        |      |





|                    |    |      |
|--------------------|----|------|
| Milieu de NELSON   | )  |      |
| Liquide amniotique | aa | 56 % |
| de brebis (3è 1/3  | )  |      |
| de gestation)      |    |      |

Milieu à base d'oeil de boeuf :

FUCHS et AHRENS (46) ont mesuré la survie des tréponèmes dans l'humeur aqueuse, dans des broyats de cristallin et de corps vitrés, provenant tous d'yeux de boeufs.

Les broyats de corps vitré non dilués et amenés à pH : 7,3 se sont montrés les plus favorables à la survie. La nécessité d'une grande quantité d'yeux (il faut 100 yeux de boeufs pour préparer 1.250 ml de milieu) nous semble être l'inconvénient majeur de ce milieu de survie.

4) Lyophilisation des milieux de survie :

La possibilité de conserver les milieux de survie servant pour le T. I. T. sous forme lyophilisée a été envisagée par plusieurs auteurs.

DELACRETAZ (28) conservait le mélange extrait embryonnaire-sérum sous cette forme pendant 4 mois, le milieu desséché étant mis en solution dans du liquide de Tyrode au moment de l'emploi. RESTA et ROSETTI (131) ont également lyophilisé le milieu à l'extrait embryonnaire de rate.

BOREL et ses collaborateurs (17) ont soumis à la lyophilisation le milieu de NELSON légèrement modifié (albumine humaine, ultra-filtrat de sérum de boeuf, dihydrostreptomycine, pénicillinase). Ce traitement n'altère pas les qualités nutritives du milieu dont la conservation est excellente durant 15 mois. Il serait souhaitable qu'un milieu standard lyophilisé soit trouvé dans le commerce, afin de réduire les difficultés de routine de travail du T. I. T. et de supprimer une des données variables de la technique.

5) Constitution du milieu utilisé dans nos recherches :

Le milieu de survie que nous avons adopté est très voisin du milieu proposé par NELSON et MAYER (98).

Il est constitué par un support proteique (albumine, ultra-filtrat de sérum de boeuf)



des sels minéraux (chlorure de sodium, et un système tampon : bicarbonate et phosphates)

des composés organiques réducteurs (thioglycolate, cysteine, glutathion, pyruvate)

un antibiotique (dihydrostreptomycine)

Il a la composition suivante :

|                                                |                   |
|------------------------------------------------|-------------------|
| - Albumine bovine (Poviet)                     | 25 000 mg         |
| - Ultra-filtrat de sérum de boeuf (I. Pasteur) | 60 ml             |
| - Chlorure de sodium (R. P. ) (1)              | 6 180 mg          |
| - Bicarbonate de sodium (R. P. )               | 718 mg            |
| - Phosphate monopotassique (R. P. )            | 1 075 mg          |
| - Phosphate disodique (R. P. )                 | 1 711 mg          |
| - Thioglycolate de sodium (R. P. )             | 500 mg            |
| - L ( ) cysteine, chlorhydrate (Roche)         | 200 mg            |
| - Glutathion (Roche)                           | 385 mg            |
| - Pyruvate de sodium (Roche)                   | 160 mg            |
| - Dihydrostreptomycine, sulfate (R. P. )       | 1 000 mg          |
| - Eau bidistillée                              | q. s. p. 1 000 ml |

- La préparation du milieu est effectuée de la manière suivante :

Des solutions mères sont d'abord réalisées dans de l'eau bidistillée neutralisée au moyen de HONa N 1/10 et stérilisée. La bidistillation est pratiquée dans un appareil en verre pyrex et sans la présence de permanganate qui, nous l'avons constaté, entraîne une légère diminution de la survie.

1) Eau physiologique :

|                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| - chlorure de sodium | 8 500 mg          |
| - eau bidistillée    | q. s. p. 1 000 ml |

2) Solution bicarbonatée :

|                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| - bicarbonate de sodium | 1 260 mg        |
| - eau bidistillée       | q. s. p. 100 ml |

(1) Nous avons indiqué à la suite de chaque produit son origine :  
RP : Rhône-Poulenc



3) Solution phosphatée :

|                            |          |          |
|----------------------------|----------|----------|
| - phosphate monopotassique |          | 2 270 mg |
| - phosphate disodique      |          | 1 250 mg |
| - eau bidistillée          | q. s. p. | 200 ml   |

4) Solution albumineuse :

|                     |          |           |
|---------------------|----------|-----------|
| - albumine de boeuf |          | 25 000 mg |
| - eau physiologique | q. s. p. | 500 ml    |

Cette dernière solution est préparée au mortier.

D'autre part, dans une fiole jaugée de 1 000 ml, les quantités suivantes de ces substances sont placées en respectant l'ordre indiqué :

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| - thioglycolate de sodium       | 500 mg   |
| - L cysteine, chlorhydrate      | 200 mg   |
| - pyruvate de sodium            | 160 mg   |
| - glutathion                    | 385 mg   |
| - dihydrostreptomycine, sulfate | 1 000 mg |

On leur ajoute dans l'ordre indiqué les volumes suivants d'ultra-filtrat et de solutions mères préparées précédemment :

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| - ultra-filtrat de sérum de boeuf | 60 ml  |
| - solution bicarbonatée           | 57 ml  |
| - solution phosphatée             | 156 ml |
| - eau physiologique               | 200 ml |

et après agitation :

|                        |        |
|------------------------|--------|
| - solution albumineuse | 500 ml |
|------------------------|--------|

Le pH du mélange ainsi obtenu est amené à 7,0 au moyen d'une solution N de soude. On complète ensuite le volume à 1 000 ml au moyen d'eau physiologique.

Le milieu est alors filtré par passage sur une série de filtres bactériologiques type FRIBOURG-BLANC (44 ), munis de membranes filtrantes SEITZ E. K. S. L'aspiration est réalisée sous vide faible (50 à 100 mm de mercure), afin de réduire la production de mousse.

Le milieu est fractionné par quantités de 30 ml, placées dans des erlenmeyers, et conservées à la température de - 20°C. La





durée maxima de sa conservation est de 3 mois.

Dans un but de simplification, nous avons tenté de supprimer la filtration. Cette suppression a été proposée par le laboratoire du T. I. T. de LYON (109). On procède de la manière suivante : la préparation du milieu est effectuée dans des récipients stériles et la présence de dihydros-treptomycine constitue une assurance supplémentaire de stérilité. L'utilisation d'un milieu de survie non filtré nous a permis d'obtenir une simplification de la manipulation et d'éviter la production de mousse gênante. En outre, la survie des tréponèmes s'est révélée meilleure dans du milieu non filtré que dans du milieu provenant du même lot mais filtré.

Nous avons ainsi préparé 9 lots différents du milieu de survie qui ont permis l'exécution de 93 séries de tests. Une série seulement s'est trouvée contaminée.

L'utilisation d'un milieu ainsi préparé peut donc être adoptée.

#### 6) Résultats obtenus - Influence favorable du sérum sanguin sur la survie des tréponèmes.

Nous avons préparé 24 lots du milieu de survie répondant tous à la formule que nous avons adoptée et selon le mode de préparation indiqué (15 lots filtrés et 9 lots non filtrés).

Parmi ces lots, un seul s'est montré incapable d'assurer une survie des tréponèmes utilisable pour la pratique du T. I. T., c'est-à-dire de conserver mobiles plus de 80 % des tréponèmes après un séjour de 22 heures en anaérobiose, en présence de sérum sanguin.

La "survie moyenne" calculée avec les résultats obtenus sur 5 à 30 séries de tests pour chaque lot du milieu, représente le pourcentage de tréponèmes ayant conservé leur mobilité après 22 heures d'abandon en atmosphère anaérobie.

Elle a été déterminée :

- avec la suspension de tréponèmes dans le milieu seul,
- avec la suspension de tréponèmes dans le milieu, additionnée de sérum humain chauffé, dépourvu d'immobilisines (à 10 % du volume total) et de complément, sérum frais de cobaye (à 30 % du volume total), ces doses représentent les conditions de pratique du T. I. T.



Les résultats de "survie moyenne" déterminés ainsi avec chaque lot de milieu sont groupés dans le tableau suivant N° 8.

TABLEAU N° 8 - Résultats de l'étude de la survie des tréponèmes dans 24 lots de milieu préparés séparément :

| Nombre de lots ayant permis une "survie moyenne"                  |                                                              |                                                          |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| dans le milieu<br>seul                                            | dans le milieu<br>10 % de sérum humain<br>30 % de complément | de :                                                     |
| 1 lot                                                             | 1 lot                                                        | 15 %<br>18 %                                             |
| 7 lots :<br>( 1 lot<br>( 1 lot<br>( 1 lot<br>( 2 lots<br>( 2 lots |                                                              | 52 %<br>60 à 65 %<br>66 à 70 %<br>71 à 75 %<br>76 à 80 % |
| 16 lots :<br>( 5 lots<br>( 6 lots<br>( 3 lots<br>( 2 lots         | 23 lots :<br>( 2 lots<br>( 5 lots<br>( 13 lots<br>( 3 lots   | 81 à 85 %<br>86 à 90 %<br>91 à 95 %<br>96 à 100 %        |

Ces résultats montrent l'influence favorable du sérum sanguin humain et de cobaye sur la survie de *Treponema pallidum*. Une amélioration très nette de cette survie en présence de sérum a été constatée notamment avec 7 lots de milieu, qui grâce à cette addition, ont vu les pourcentages de motilité des tréponèmes s'élever au-dessus de 80 % et devenir ainsi utilisables pour l'exécution du T. I. T. : pour quelques essais de certains lots, les pourcentages de survie étaient très faibles dans le milieu seul (20 %, 40 %, 50 %...), mais atteignaient des valeurs presque maxima (85 %, 90 %, 95 %...) en présence de sérum humain et de sérum de cobaye.

Il est difficile d'identifier la véritable cause de cette influence heureuse du sérum sanguin sur la survie de *Treponema pallidum* : Elle ne peut être attribuée à l'alexine, en effet le sérum humain était toujours inactivé par chauffage avant son utilisation et nous avons obtenus des résultats sensiblement identiques en remplaçant le sérum frais



de cobaye par le même sérum préalablement inactivé par chauffage.

L'action des sérums peut être le fait de l'apport proteique non négligeable qu'il réalise, ou elle peut être due à la présence dans les sérums d'un facteur de survie pour *Treponema pallidum*.

On peut encore invoquer que le sérum sanguin possède une activité "anti-oxygène" que nous avons pu mettre en évidence en étudiant la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère aérobie au cours d'essais que nous reproduisons dans le paragraphe suivant :

Influence du sérum sanguin sur la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère aérobie.

Des suspensions de tréponèmes, réalisées dans le milieu de survie adopté, étaient réparties dans des "tubes à hémolyse", à raison de 0,35 ml par tube, les tubes étaient placés à 35°C en aérobiose (atmosphère ambiante du laboratoire). Certaines prises d'essai étaient additionnées de sérum sanguin, à la dose de 0,15 ml de sérum par tube.

Avant chaque examen, le contenu des tubes était homogénéisé par une brève agitation et une goutte du liquide était prélevée par capillarité au moyen d'une pipette Pasteur, pour être examinée à l'ultramicroscope.

La survie des tréponèmes dans de telles conditions a été étudiée en déterminant le pourcentage de spirochètes restés mobiles, toutes les 10 minutes, pour chaque système.

Des résultats ainsi obtenus, en utilisant le sérum humain inactivé et le sérum de cobaye, frais ou inactivé, sont reproduits dans le tableau suivant N° 9.





TABLEAU N° 9 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie dans le milieu de survie additionné ou non de sérum :

|         | Systèmes utilisés                       |                                      |                                        |                                     |
|---------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
|         | Susp. TP<br>en milieu de<br>survie seul | Susp. TP<br>+<br>Sér. H.<br>inactivé | Susp. TP<br>+<br>Sér. Cob.<br>inactivé | Susp. TP<br>+<br>Sér. Cob.<br>frais |
| Heure 0 | 96                                      | 96                                   | 96                                     | 96                                  |
| 10 '    | 88                                      | 96                                   | 96                                     | 96                                  |
| 20 '    | 70                                      | 88                                   | 92                                     | 94                                  |
| 30 '    | 64                                      | 88                                   | 92                                     | 94                                  |
| 40 '    | 62                                      | 84                                   | 92                                     | 90                                  |
| 50 '    | 50                                      | 78                                   | 88                                     | 88                                  |
| 60 '    | 40                                      | 72                                   | 88                                     | 80                                  |
| 120 '   | 26                                      | 60                                   | 72                                     |                                     |

On constate donc qu'en atmosphère aérobie, dans le milieu de survie seul, les tréponèmes perdent assez vite leur mobilité et que l'addition de sérum sanguin humain ou de cobaye retarde de manière importante cette immobilisation. Il y a donc un pouvoir protecteur "anti-oxygène" du sérum sanguin pour *Treponema pallidum*.

Ce pouvoir nous est apparu comme indépendant de l'activité complémentaire des sérums, et nous avons même enregistré une action légèrement plus efficace sur la survie en opérant avec des sérums préalablement chauffés.

Cet essai, reproduit dans le tableau n° 9, mené parallèlement dans plusieurs séries a montré une parfaite répétition des résultats.

Par contre, la modification de l'un des réactifs, soit la suspension tréponémique, soit le sérum sanguin, provoquait une accélération ou un retard dans la perte de mobilité des tréponèmes, tout en permettant d'observer constamment la prolongation de la survie des tréponèmes par la présence de sérum sanguin.

Nous avons essayé de préciser dans quelles conditions s'ef-



effectuait cette variation.

a) La variation du pouvoir "anti-oxygène" du sérum selon l'espèce a été étudiée sur des sérums de cobaye, de lapin, de mouton, de boeuf et sur du sérum humain. L'ultra-filtrat de sérum de boeuf et de cheval ont été également essayés.

La même suspension tréponémique, présentant 10 tréponèmes par champ microscopique, a été utilisée dans cet essai, les différents sérums avaient tous été inactivés par chauffage de 30 minutes à 56°C.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant N° 10.

TABLEAU N° 10 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie dans le milieu de survie additionné de sérum de différentes espèces :

|         | Homme | Cobaye | Lapin | Mouton | Boeuf | UF<br>Boeuf | UF<br>Cheval | Milieu<br>de sur-<br>vie seul |
|---------|-------|--------|-------|--------|-------|-------------|--------------|-------------------------------|
| Heure 0 | 96    | 96     | 96    | 96     | 96    | 96          | 96           | 96                            |
| 10'     | 96    | 96     | 96    | 96     | 94    | 92          | 94           | 90                            |
| 20'     | 88    | 96     | 94    | 90     | 92    | 90          | 88           | 72                            |
| 30'     | 88    | 94     | 92    | 90     | 90    | 90          | 84           | 64                            |
| 40'     | 84    | 94     | 90    | 84     | 90    | 88          | 82           | 64                            |
| 50'     | 78    | 90     | 84    | 82     | 88    | 80          | 80           | 52                            |
| 60'     | 72    | 88     | 72    | 78     | 82    | 80          | 78           | 42                            |
| 120'    | 60    | 80     | 70    | 74     | 72    | 64          | 68           | 20                            |

UF : Ultra-filtrat de sérum

Comme dans l'essai précédant, les quantités suivantes des divers réactifs étaient :

Suspension tréponémique : 0,35 ml

Sérum à étudier : 0,15 ml

L'examen des résultats portés dans ce tableau nous montre que le pouvoir protecteur varie légèrement avec l'espèce et que c'est chez



le cobaye qu'il semble le plus élevé.

Les ultra-filtrats de sérum présentent une action sensiblement égale à celle des sérums, l'ultra-filtrat de sérum de boeuf et celui de cheval donnent des résultats peu différents, contrairement aux résultats enregistrés lors de l'étude de l'influence des ultra-filtrats de sérum sur la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère anaérobie, l'ultra-filtrat de sérum de boeuf se révélait alors plus efficace que celui de cheval.

Pour une même espèce, le pouvoir protecteur varie également avec l'échantillon de sérum examiné, cette variation a été étudiée en observant le comportement de 6 sérums humains dans cette expérience. Nous indiquons dans le tableau suivant N° 11 les résultats obtenus avec le sérum à pouvoir "anti-oxygène" minimum et celui à pouvoir maximum.

TABLEAU N° 11 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie, dans le milieu de survie additionné de sérum humain provenant de différents individus :

|         | Sérum N° 4 (pouvoir anti-oxygène minimum) | Sérum N° 1 (pouvoir anti-oxygène maximum) |
|---------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Heure 0 | 100                                       | 100                                       |
| 10'     | 98                                        | 98                                        |
| 20'     | 90                                        | 96                                        |
| 30'     | 84                                        | 91                                        |
| 40'     | 80                                        | 90                                        |
| 50'     | 76                                        | 90                                        |
| 60'     | 72                                        | 84                                        |
| 120'    | 50                                        | 78                                        |

Un décalage de 10 % est donc observé après 40 minutes dans la survie des tréponèmes et de 28 % après 120 minutes. Ce décalage a été retrouvé en renouvelant cet essai.

Avec trois échantillons de sérum provenant d'un même individu et prélevés chacun à un mois d'intervalle puis stockés, nous avons également observé des variations du pouvoir protecteur en les examinant simultanément.





Les résultats enregistrés sont notés dans le tableau suivant  
N° 12.

TABLEAU N° 12 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie, dans le milieu de survie additionné de différents échantillons de sérum humain provenant d'un même individu :

|         | Sérum N° 1 | Sérum N° 2 | Sérum N° 3 |
|---------|------------|------------|------------|
| Heure 0 | 98         | 98         | 98         |
| 10'     | 94         | 98         | 92         |
| 20'     | 92         | 94         | 92         |
| 30'     | 82         | 90         | 80         |
| 40'     | 80         | 86         | 76         |
| 50'     | 74         | 80         | 70         |
| 60'     | 72         | 80         | 70         |
| 120'    | 58         | 68         | 50         |

On voit donc que le pouvoir protecteur "anti-oxygène" du sérum d'un même individu varie légèrement en un mois d'intervalle.

Les concentrations proteiques du sérum demeurant sensiblement égales, cette observation plaide en faveur de l'intervention d'un "facteur anti- oxygène" pour *Treponema pallidum*, qui serait présent dans le sérum sanguin et dont le taux serait variable pour les différentes espèces et pour un même individu.

b) La variation du pouvoir protecteur "anti-oxygène" d'un même échantillon de sérum pour *Treponema pallidum* avec différentes suspensions tréponémiques a été également étudiée.

Les variations observées peuvent être dues à la densité tréponémique qui n'est jamais retrouvée identique d'une suspension à l'autre, ou bien à la présence en plus ou moins grande quantité de suc testiculaire qui passe dans la suspension lors de l'extraction des tréponèmes du testicule.

Influence de la densité tréponémique : Le même échantillon de sérum de cobaye a été étudié selon la technique décrite au moyen de 3



suspensions de densité tréponémique croissante : une suspension montrant 5 tréponèmes par champ microscopique, une deuxième montrant 10 tréponèmes et une troisième 20 tréponèmes par champ.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant N° 13.

TABLEAU N° 13 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie, dans le milieu de survie additionné de sérum de cobaye et dans différentes suspensions de densité tréponémique différente :

|       |      | Suspension N° 1<br>(5 TP/champ) | Suspension N° 2<br>(10 TP/champ) | Suspension N° 3<br>(20 TP/champ) |
|-------|------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Heure | 0    | 96                              | 96                               | 96                               |
|       | 10'  | 96                              | 94                               | 94                               |
|       | 20'  | 94                              | 90                               | 90                               |
|       | 30'  | 94                              | 90                               | 86                               |
|       | 40'  | 92                              | 88                               | 80                               |
|       | 50'  | 90                              | 76                               | 70                               |
|       | 60'  | 86                              | 74                               | 66                               |
|       | 120' | 80                              | 70                               | 52                               |

TP : Treponema pallidum

On remarque donc que l'effet protecteur "anti-oxygène" du sérum diminue lorsque la densité tréponémique s'élève. Cette observation est également en faveur de la présence d'un facteur sérique responsable de ce phénomène et qui pourrait intervenir dans le métabolisme des tréponèmes. Alors que la concentration proteique du mélange reste constante, la quantité de ce facteur utilisable par chaque microorganisme diminue avec l'augmentation de la densité tréponémique.

Le décalage ainsi observé a été retrouvé avec d'autres échantillons de sérums.

Influence du suc testiculaire sur la survie de Treponema pallidum en atmosphère aérobie :

Pour effectuer cette étude, nous avons extrait du suc tes-



ticulaire de la manière suivante : 2 testicules d'un lapin sain, déchiquetés et lavés à l'aide d'eau physiologique pour les débarrasser de sang, sont placés dans 10,0 ml d'eau physiologique à 35°C pendant 30 minutes. Le liquide d'extraction est décanté et centrifugé 5 minutes à 1200 t/m.

La perte de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie a été étudiée comparativement avec la même suspension tréponémique dans le milieu de survie seul, dans le milieu additionné du suc testiculaire préparé, à raison de 0,15 ml pour 0,35 ml de suspension, et dans le milieu additionné de sérum de cobaye à raison de 0,15 ml pour 0,35 ml de suspension.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant N° 14.

TABLEAU N° 14 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie dans le milieu de survie seul et dans le milieu additionné de suc testiculaire ou de sérum de cobaye :

|         | Susp. TP dans<br>le milieu seul | Susp. TP<br>+<br>Suc testiculaire | Susp. TP<br>+<br>Sér. cobaye |
|---------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Heure 0 | 98                              | 98                                | 98                           |
| 10'     | 84                              | 94                                | 96                           |
| 20'     | 72                              | 90                                | 92                           |
| 30'     | 60                              | 86                                | 90                           |
| 40'     | 52                              | 76                                | 90                           |
| 50'     | 48                              | 70                                | 84                           |
| 60'     | 40                              | 70                                | 82                           |
| 120'    | 32                              | 58                                | 68                           |

Les résultats ainsi obtenus nous montrent que le suc testiculaire entraîne une prolongation de la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère aérobie, son action est cependant sensiblement inférieure à celle observée avec le sérum sanguin.

Influence du L. C. R. sur la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère aérobie :

Nous nous sommes demandés quel serait le mode d'action





du L. C. R. utilisé à la place du sérum sanguin dans les mêmes conditions. La perte de mobilité des tréponèmes a été étudiée comparativement avec la même suspension tréponémique dans le milieu de survie seul, dans le milieu additionné de L. C. R. , et dans le milieu additionné de sérum sanguin. Les résultats de cette expérience sont donnés dans le tableau suivant N° 15.

TABLEAU N° 15 - Pourcentage de mobilité des tréponèmes en atmosphère aérobie dans le milieu seul et additionné de L. C. R. ou de sérum sanguin

|         | Susp. TP dans<br>le milieu seul | Susp. TP<br>+<br>L. C. R. | Susp. TP<br>+<br>Sérum |
|---------|---------------------------------|---------------------------|------------------------|
| Heure 0 | 96                              | 96                        | 96                     |
| 10'     | 82                              | 90                        | 96                     |
| 20'     | 72                              | 82                        | 90                     |
| 30'     | 68                              | 74                        | 86                     |
| 40'     | 68                              | 60                        | 86                     |
| 50'     | 42                              | 58                        | 82                     |
| 60'     | 40                              | 54                        | 80                     |
| 120'    | 34                              | 42                        | 70                     |

Le L. C. R. n'a donc montré qu'une légère action retardatrice sur la perte de la mobilité des tréponèmes en anaérobiose. Ce faible pouvoir peut s'expliquer par une pauvreté en "facteur anti-oxygène" du L. C. R. comme par le plus faible apport proteique du liquide comparé au sérum sanguin.



### CHAPITRE III

#### TECHNIQUE D'EXECUTION DU T. I. T.



## CHAPITRE III

### TECHNIQUE D'EXECUTION DU T. I. T.

#### 1) Préparation de la suspension antigénique :

Les lapins ayant subi l'inoculation intra-testiculaire sont examinés quotidiennement. L'orchite se déclare en principe du 5<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour suivant l'inoculation. Les signes en sont: l'augmentation de volume, la consistance plus ferme et la température plus élevée du testicule ainsi qu'une diminution de la fluctuation du testicule dans le sac scrotal. L'orchite devra être utilisée pour l'exécution d'une série de tests dans les trois jours suivant son apparition.

Le lapin est sacrifié par une injection de 20 à 40 cm<sup>3</sup> d'air dans la veine marginale du bord interne de l'oreille. Les testicules sont alors prélevés stérilement par un opérateur muni de gants de caoutchouc protecteurs, les pédicules scrotaux sont serrés au moyen d'un clamp, puis sectionnés à l'aide d'une paire de ciseaux, le sac scrotal est flambé une 1<sup>ère</sup> fois pour en éliminer les poils, une 2<sup>ème</sup> fois pour le rendre aseptique en utilisant quelques gouttes d'alcool à 95°. L'opérateur saisit le sac scrotal en serrant le pédicule d'une main, de l'autre il sectionne au moyen d'un bistouri la 1<sup>ère</sup> enveloppe, puis la 2<sup>ème</sup>, le testicule, qui fait hernie, est ainsi saisi à l'aide d'une pince à griffes, puis débarrassé des tissus péri-testiculaires (épididyme).

Le testicule isolé est ensuite lavé par arrosage à l'eau physiologique glacée (pour éliminer la plus grande quantité possible de sang), et est déposé dans une boîte de Pétri- pour y être découpé en minces lames transversales, puis longitudinales, reliées par un pont de tissu préservé pour conserver son unité. Un fragment tissulaire prélevé au sein du testicule et de la grosseur d'une lentille est déposé dans une goutte d'eau physiologique (0,05 ml) sur une lame mince pour ultra-microscope, il est agité au moyen d'une ôse de platine pendant 20 secondes. Le second testicule subit le même traitement. Les préparations recouvertes de lamelles sont examinées à l'ultra-microscope afin de vérifier la présence de tréponèmes et d'en noter la quantité observée par



champ microscopique.

Toutes ces manipulations sont pratiquées rapidement, à l'abri de tout déplacement d'air, en observant une rigoureuse asepsie.

Les testicules ainsi déchiquetés sont déposés dans une fiole de SAUSSE (149) contenant une quantité de milieu de survie correspondant à la moitié du volume total nécessaire à l'exécution de la série de tests. On réalise l'anaérobiose dans le récipient en le vidant d'air que l'on remplace par du mélange gazeux d'azote (95 %) et de gaz carbonique (5 %). L'atmosphère de la fiole a été purgée, puis renouvelée par 3 fois pour en éliminer toute trace d'oxygène.

La fiole est placée au bain-marie à 35°C pour permettre le passage des tréponèmes du milieu tissulaire dans le milieu liquide. Le temps que doit durer cette opération est fonction de la richesse tréponémique notée, de la grosseur des testicules et de la quantité de milieu de survie utilisée. Nous l'avons établi empiriquement à la suite de nombreux essais.

Par exemple :-2 testicules de volume important, riches en tréponèmes additionnés de 15 ml de milieu nécessitent un temps d'incubation de 5 minutes.

- 2 testicules de volume moyen, pauvres en tréponèmes, additionnés de 15 ml de milieu nécessitent un temps d'incubation de 30 minutes.

Il s'agit, en effet, d'obtenir une suspension montrant à l'ultra-microscope environ 20 tréponèmes par champ microscopique afin que la densité finale corresponde à 10 tréponèmes par champ.

Dans le 1<sup>er</sup> cas, un volume de suspension tréponémique sera dilué avec une partie égale de milieu neuf.

Si au contraire, le 1<sup>er</sup> extractif se révèle pauvre, il sera procédé à une deuxième extraction des mêmes testicules avec une nouvelle quantité identique de milieu neuf.

Dans les cas extrêmes, une légère agitation pourra être imprimée à la fiole d'extraction afin de faciliter la dispersion des tréponèmes. Cette dernière agitation reste cependant à déconseiller car elle augmente le passage de suc testiculaire dans le matériel antigénique.





La suspension tréponémique obtenue est centrifugée 5 minutes à 1200 t/m afin d'en éliminer hématies, leucocytes, spermatozoïdes et débris tissulaires.

Après décantation dans un erlenmayer, la densité tréponémique est à nouveau vérifiée par examen au microscope à fond noir de 0,025 ml de suspension recouverte d'une lamelle de 18 X 18 mm (précision à respecter pour se retrouver dans les mêmes conditions d'une série de test à l'autre). La centrifugation n'abaisse pas pratiquement cette densité.

La densité tréponémique idéale pour la suspension antigénique est de 10 tréponèmes par champ microscopique (oculaire 10 - objectif 40). La mobilité des tréponèmes sera également contrôlée en notant le pourcentage de tréponèmes initialement immobiles, qui doit être trouvé pratiquement nul.

## II) Exécution de la Réaction :

Tandis qu'un premier opérateur prépare la suspension antigénique, un deuxième opérateur met en présence les différents réactifs, la suspension antigénique étant ajoutée en dernier lieu et immédiatement après la fin de sa préparation.

Prélèvements à tester :

Chaque sérum, ou L. C. R. , est réparti dans 2 tubes. L'un sert à la réaction, l'autre joue le rôle de témoin :

- dans le tube à réaction, on place =

- 0,05 ml de sérum (ou L. C. R. )
- 0,15 ml de complément actif
- 0,35 ml de suspension tréponémique

- dans le tube témoin =

- 0,05 ml de sérum (ou L. C. R. )
- 0,15 ml de complément inactivé
- 0,35 ml de suspension tréponémique

Le complément utilisé est représenté par un mélange de sérums de plusieurs cobayes, prélevés stérilement par ponction cardiaque, chez des animaux mâles et à jeun, il est conservé à - 60°C, durant un mois au maximum, ce mélange est employé pur dans l'exécution de la



réaction, le complément inactivé provient du même lot et a été chauffé à 56°C pendant 30 minutes.

Témoins :

On prépare également la série des témoins suivants qui accompagnent chaque série de tests, en utilisant notamment un "sérum négatif" connu, provenant d'un sujet sain, et un "pool" qui a été préparé en mélangeant des sérums de syphilitiques riches en anticorps, et qui est conservé à -20°C pour servir lors de l'exécution de chaque série de tests : le pool est employé pour réaliser 5 dilutions croissantes dans l'eau physiologique :

Protocole de témoins :

| Numéro des tubes             | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Suspension tréponémique (ml) | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| Complément actif (ml)        |      |      |      | 0,15 |      | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| Complément inactivé (ml)     |      |      | 0,15 |      | 0,15 |      |      |      |      |      |
| Sérum "négatif" (ml)         |      |      | 0,05 | 0,05 |      |      |      |      |      |      |
| Pool Dilution 1/x (ml)       |      |      |      |      | 0,05 | 0,05 |      |      |      |      |
| Pool Dilution 1/2x (ml)      |      |      |      |      |      |      | 0,05 |      |      |      |
| Pool Dilution 1/4x (ml)      |      |      |      |      |      |      |      | 0,05 |      |      |
| Pool Dilution 1/8x(ml)       |      |      |      |      |      |      |      |      | 0,05 |      |
| Pool Dilution 1/16x(ml)      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 0,05 |
| Eau physiologique (ml)       |      | 0,05 |      |      |      |      |      |      |      |      |



Le tube 1 constitue le témoin de la survie des tréponèmes dans le milieu de survie seul.

Les tubes 3 et 4 servent de "témoin négatif" et permettent de s'assurer de la survie des tréponèmes en l'absence d'anticorps immobilisants et de la non toxicité du complément utilisé.

Les tubes 5 à 10 correspondent au "témoin positif", le tube 5 contrôle la non toxicité du pool pour les tréponèmes en l'absence de complément actif, les tubes 6, 7, 8, 9, 10 servent à vérifier l'immobilisation des tréponèmes en présence d'immobilisines : le taux des dilutions du pool a été choisi après essai afin d'obtenir du tube 6 (dilution la plus faible) au tube 10 (dilution la plus élevée) des immobilisations allant de 100 % à 20 %.

Ces dilutions permettent donc d'apprécier la sensibilité du test, en comparant les résultats du jour avec le titre standard déterminé par la moyenne de 4 expertises différentes.

Le tube 2 est le témoin de la non toxicité à l'égard des tréponèmes, de l'eau physiologique qui a servi à diluer le pool.

#### Temps de Contact :

Les tubes sont placés dans un dessiccateur à vide après une brève agitation. Une atmosphère anaérobie y est établie au moyen du mélange d'azote (95 %) et de gaz carbonique (5 %), après avoir effectué 3 purges successives.

L'ensemble est porté à l'étuve à 35 °C, durant 22 heures.

#### III) Lecture du Test :

Après légère agitation de chaque tube, on prélève une goutte du liquide au moyen d'une pipette Pasteur et on la place entre lame et lamelle, on examine chaque préparation à l'ultra-microscope en observant 50 tréponèmes afin de noter le nombre de germes ayant conservé leur mobilité, cette numération est effectuée à l'aide d'un compte-unité à main.

Les tréponèmes mobiles présentent une grande luminosité et montrent des mouvements pendulaires et de vrille. Les mouvements d'ondulation passant le long du microorganisme (chaque boucle faisant tour à tour une rotation de 180°) ont été confirmés récemment par





SEQUEIRA (151) qui considère le tréponème comme non spiralé mais plat avec des mouvements d'ondulation.

Les tréponèmes ayant perdu leur mobilité peuvent se présenter sous 2 aspects différents :

1°) S'il y a eu immobilisation "spécifique" (due à l'action des anticorps immobilisants), ils apparaissent beaucoup moins lumineux, plus ou moins lysés, et assez souvent disposés par groupe de deux à quatre, montrant une agglutination de type "stellaire" (agglutination qui avait été signalée par TOURAINE en 1912 (159), la densité tréponémique de la suspension a considérablement diminué par suite de la lyse d'une partie des tréponèmes.

2°) S'il y a eu immobilisation "toxique" (constatée dans le tube à réaction et dans le tube témoin) qui peut être due à la présence dans le sérum de pénicilline, de cyanure, de sels de bismuth, d'impuretés diverses ou à une contamination bactérienne, les tréponèmes restent assez lumineux et sont beaucoup moins déformés, ils ne sont généralement pas lysés, ni agglutinés, et la densité tréponémique se maintient sensiblement égale.

Ces deux aspects des tréponèmes immobilisés au cours du T. I. T. ont été particulièrement étudiés par GREIFELT (52).

#### Expression des résultats :

Le pourcentage d'immobilisation spécifique (I. S. ) des tréponèmes est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ I. S. } = \frac{\% \text{ TP mob. /témoin} - \% \text{ TP mob. /réact.}}{\% \text{ TP mob. /témoin}} \times 100$$

% TP mob. /témoin = pourcentage de *Treponema pallidum* (TP) dans le tube témoin,

% TP mob. /réact. = pourcentage de *Treponema pallidum* dans le tube à réaction.

L'interprétation clinique des résultats se fait à l'aide du critère de NELSON qui peut se résumer ainsi :

| % I. S. (immobilisation spécifique) | Interprétation des résultats |
|-------------------------------------|------------------------------|
| de 0 à 20 %                         | Négatif                      |
| de 21 à 50 %                        | Douteux (faible positif)     |
| de 51 à 100 %                       | Positif                      |



Tests non interprétables :

Les immobilisations obtenues dans le tube témoin, sans la présence de complément, impliquent l'existence d'une substance tréponémicide dans le prélèvement examiné. Tout test ayant donné une survie inférieure à 80 % dans le tube témoin est considéré comme non satisfaisant. Il doit être recommencé, après addition de pénicillinase, ajoutée au dixième et après abandon durant 10 minutes à 35°C, pour le cas où la toxicité du sérum serait due à la présence de pénicilline. Si l'immobilisation toxique est confirmée, le test est considéré comme "illisible", le sérum s'avérant tréponémicide.

Les prélèvements contaminés seront également soumis à un second test, après un 2<sup>ème</sup> chauffage à 56°C durant 30 minutes, celui-ci n'altère pas les anticorps immobilisants et détruit la contamination bactérienne (tyndallisation).

Titrage du complément résiduel:

Après lecture de l'immobilisation, on recherche la présence de complément résiduel dans les tubes à réaction pour s'assurer que l'immobilisation des tréponèmes par les anticorps n'a pu être déficiente par manque d'alexine.

L'absence de complément est également notée dans les tubes témoins, notamment ceux qui ont donné une immobilisation.

Nous utilisons la technique simplifiée suivante :

- dans chaque tube, on ajoute = 0,30 ml d'une suspension dans l'eau physiologique de globules rouges de moutons sensibilisés, cette suspension est obtenue en mélangeant :
  - 0,50 ml de culot globulaire (obtenu par lavage, rétablissement au volume initial du sang et centrifugation à 6000 t/m pendant 5 minutes)
  - 25,0 ml de sérum hémolytique (I. Pasteur-correspondant à 10 000 unités BORDET-VASSERMANN par ml) dilué au 1/500 dans l'eau physiologique
  - 24,5 ml d'eau physiologique



Le tout est placé, après agitation, durant 30 minutes à 37°C.

Les tubes à réaction additionnés de cette suspension doivent montrer une hémolyse totale après 10 minutes à 37°C, les tubes témoins doivent indiquer une absence d'hémolyse.

#### IV) Contrôle du mélange gazeux :

Nous avons signalé que le mélange gazeux servant à la réalisation de l'anaérobiose était composé :

- de 95 % d'azote
- et de 5 % de gaz carbonique.

Le mélange gazeux que nous avons utilisé était préparé par la Compagnie Française des Produits Oxygénés. Département "Gazothérapie".

La présence du gaz carbonique : s'avère indispensable. En effet, la survie des tréponèmes en azote pure est considérablement abaissée. D'autre part, RANQUE et ses collaborateurs (123) ont tenté de maintenir en survie *Treponema pallidum* en réalisant l'anaérobiose au moyen d'autres techniques telles que l'emploi de tubes bouchés avec des cotons imprégnés de solution de pyrogallol et l'adjonction de réductoses non toxiques pour le tréponème. Dans ces conditions, la survie n'a jamais dépassé 60 % après 24 heures. La présence du gaz carbonique semble donc nécessaire pour maintenir cette survie totale. HAMELIN (54) pense qu'il joue un rôle dans le maintien de l'équilibre ionique du milieu.

La survie de *Treponema pallidum* nécessitant, une stricte anaérobiose, la teneur maxima en oxygène du mélange gazeux doit être très faible. Celle du mélange utilisé dans notre Laboratoire était de 0,02 %. En fait, l'examen des teneurs maxima des mélanges employés par les différents laboratoires du T. I. T. révèle de grandes différences. Elle varie de 0,0002 % (Palerme) à 1 % (Chamblee).

D'autres laboratoires, ayant à leur disposition des mélanges trop oxygénés, les désoxygènent par passage sur de la tournure de cuivre chauffée au rouge, ou le prépare extemporanément au moyen des mélanges suivants :

$\text{NH}_4 + \text{NaNO}_2$  et  $\text{CaCO}_3 + \text{HCl}$  (Sofia-Bulgarie).





La teneur en oxygène peut être contrôlée par barbotage dans le pyrogallol basique qui noircit en présence de la moindre trace d'oxygène.

Le problème de la qualité du gaz nous est apparu comme très important et nous sommes convaincus que la plus grande partie des échecs de survie observés dans certains de nos essais, était due à une imperfection du mélange gazeux. La fragilité du tréponème fait dépendre sa vitalité de la moindre trace d'impureté, ce qui peut expliquer l'abaissement de la survie même avec l'utilisation de gaz à teneur en oxygène pourtant des plus faibles. C'est pourquoi l'essai au pyrogallol nous paraît insuffisant et nous avons préféré lui substituer un contrôle biologique qui consiste en un test de survie des tréponèmes en présence du gaz à essayer :

Au cours d'un même essai, 2 séries parallèles de mêmes sérums seront testés avec la même suspension tréponémique et le même lot de complément (milieu de survie et complément connus et efficaces), la 1<sup>ère</sup> série est mise en atmosphère anaérobie avec un mélange gazeux déjà utilisé et conservant la survie des tréponèmes, la 2<sup>ème</sup> série avec le mélange à contrôler.

Une comparaison des survies permettra d'établir la valeur du nouveau mélange gazeux, et, le cas échéant, de le rejeter.

Nous signalerons également que la pression régnant à l'intérieur du récipient où est réalisé l'anaérobiose, doit être égale à la pression atmosphérique. En effet, RANQUE et DEPIEDS (126) ont montré qu'une hyperpression amenait une inhibition de l'immobilisation des tréponèmes par les anticorps. Ce phénomène est observé à partir d'une surpression de  $0,250 \text{ kg/cm}^2$  et devient très net lorsque la surpression atteint  $0,500 \text{ kg/cm}^2$  : ainsi des sérums provoquant 100 % d'I. S. dans les conditions habituelles, ne donnent plus que 32 % et 18 % d'I. S. . . .

En fait, l'hyperpression amène une inhibition du complément, contrôlable avec un système hémolytique. Le complément n'est d'ailleurs pas détruit et il exerce de nouveau son action lorsque la pression atmosphérique est rétablie. On ne constate donc qu'une inhibition temporaire des manifestations alexiques sous pression supérieure à la pression atmosphérique.





C H A P I T R E \_ I V

ROLE DU COMPLEMENT



## C H A P I T R E I V

### ROLE DU COMPLEMENT

L'efficacité du complément (ajouté sous forme de sérum de cobaye) dans l'immobilisation des tréponèmes par les sérums syphilitiques a été démontrée par NELSON (98) : cette immobilisation n'a plus lieu lorsque le sérum de cobaye utilisé a été soumis à un chauffage préalable à 56°C durant 30 minutes, ou a été mis en contact d'un système antigène-anticorps homologue (ovalbumine et sérum de lapin anti-ovalbumine) qui fixe l'alexine.

La dilution nécessaire à la réaction a été fixée à 1/20 par NELSON et ses collaborateurs (97) (98), au 1/18 par THOMPSON et MAGNUSON (158).

Dans la technique que nous avons adoptée, le complément est employé à une dose réalisant une concentration de 30 % du volume total. Ce taux tient compte de l'augmentation de la teneur du milieu de survie en thioglycolate de sodium qui possède une activité anti-complémentaire, ainsi que de la nécessité d'effectuer le T. I. T. en présence d'un excès de complément.

Cette concentration en alexine ne doit pas être dépassée car elle entraînerait alors une mauvaise survie des tréponèmes. En effet, nous avons observé qu'un complément à la concentration de 35 % du volume total présente une plus ou moins grande activité immobilisante suivant les lots de sérum de cobaye utilisé. Ce phénomène a été remarqué dans de nombreux laboratoires (54) (124). Il peut être en rapport avec les propriétés bactéricides de la properdine.

L'insuffisance relative du complément dans le T. I. T. peut constituer une source d'erreur par défaut en abaissant le pourcentage d'immobilisation spécifique. L'inhibition et la destruction facile de l'alexine par différents facteurs nécessitent donc un contrôle préalable de son activité.



a) Titrage préalable du lot de complément :

Le titrage du pouvoir alexique peut être effectué à l'aide d'un système hémolytique. Pratiquement le mélange d'un grand nombre de sérums de cobayes fournit toujours un complément d'activité hémolytique sensiblement égale. Ce titrage est effectué suivant la technique de KOLMER (68) (30). Cependant, le complément étant constitué par au moins 4 composants de nature chimique différente (2), il n'est pas certain que ceux qui interviennent dans la réaction d'immobilisation des tréponèmes, soient les mêmes que ceux qui agissent dans la réaction d'hémolyse des globules rouges par le sérum hémolytique.

C'est pourquoi nous préférons exécuter le contrôle préalable d'un lot de complément en vérifiant son activité dans l'immobilisation des tréponèmes par les anticorps immobilisants :

A cet effet, nous réalisons 2 séries parallèles de dilutions identiques d'un pool (mélange de sérums syphilitiques connus et riches en anticorps) qui sont soumises au T. I. T., en présence de la même suspension antigénique, dans la 1<sup>ère</sup> série, nous utilisons un lot de complément connu et efficace, dans la 2<sup>ème</sup> série, le complément nouveau, des pourcentages d'immobilisation sensiblement identiques doivent être obtenus pour les mêmes dilutions.

Nous devons signaler que les différences de pourcentage sont plus fréquentes et plus importantes avec des quantités minimales d'anticorps, comme le montre le tableau N° 16 dans lequel sont indiqués les différents pourcentages d'immobilisation obtenus avec les mêmes dilutions d'un pool en utilisant 5 lots différents de complément.

Dans chaque tube, les différents éléments entrant dans la réaction, avaient été répartis aux concentrations habituelles :

- Suspension tréponémique : 0,35 ml
- Dilution du pool : 0,05 ml
- Complément examiné : 0,15 ml





TABLEAU N° 16 - Titrage préalable du complément (examen de 5 lots différents) :

| Dilutions du pool | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1/8               | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| 1/16              | 88 %  | 84 %  | 86 %  | 80 %  | 90 %  |
| 1/32              | 64 %  | 60 %  | 66 %  | 52 %  | 71 %  |
| 1/64              | 56 %  | 48 %  | 52 %  | 40 %  | 64 %  |
| 1/128             | 14 %  | 4 %   | 6 %   | 2 %   | 22 %  |

b) Titration du complément résiduel :

Nous avons indiqué qu'après la lecture du test d'immobilisation, la recherche de complément résiduel doit être pratiquée dans les tubes à réaction. On s'assure ainsi que le T. I. T. s'est effectué en présence d'un excès de complément et que les résultats trouvés négatifs ou faiblement positifs ne sont pas le fait d'une quantité insuffisante d'alexine.

La vérification d'une activité hémolytique résiduelle comme moyen de contrôle entraîne les mêmes remarques que celles exposées dans le titrage préalable, la fraction alexique permettant l'hémolyse n'est pas nécessairement identique à celle qui permet l'immobilisation des tréponèmes en présence d'immobilisines. L'existence d'une activité hémolytique résiduelle après le T. I. T. n'est peut-être pas, de ce fait, la preuve d'une activité immobilisante complète de l'alexine au cours de la réaction. On peut toujours craindre que certains sérums ne contiennent des substances capables d'inhiber l'immobilisation des tréponèmes sans inhiber l'hémolyse. La reproductibilité des résultats serait alors compromise.

Aussi une technique différente de recherche du complément résiduel a été proposée : elle consiste à ajouter une quantité importante d'anticorps immobilisants, sous forme d'un sérum connu de syphilitique, dans les tubes à réaction où l'immobilisation des tréponèmes s'est révélée nulle ou partielle. S'il y a présence de complément en excès, ces tréponèmes seront alors immobilisés par les anticorps ajoutés, les tubes sont placés en anaérobiose à 35°C, et, après 10 heures de contact, on vérifie l'immobilisation des tréponèmes, apportant la preuve d'une activité immobilisante résiduelle de l'alexine.



Ce procédé est certainement plus valable que la technique hémolytique mais présente l'inconvénient d'une manipulation plus longue et plus délicate.

La reproductibilité enregistrée dans nos résultats de T. I. T. a montré l'efficacité de la dose élevée (30 % du volume total) de complément utilisé, qui permet d'éviter ainsi une déficience alexique.

c) Fixation de complément au cours du T. I. T. :

Nous avons tenté de préciser les rapports existants entre le pouvoir hémolytique du complément et son rôle dans l'immobilisation. Cette étude a consisté à remplacer la recherche qualitative d'une activité hémolytique résiduelle après le T. I. T. , par un titrage quantitatif cinétique.

L'utilisation de système hémolytique permet, dans certaines conditions, de faire varier le délai d'apparition de l'hémolyse en fonction du taux de complément : ainsi l'hémolyse est de plus en plus retardée au fur et à mesure que la concentration en complément diminue.

Ce procédé permet de déterminer la valeur de l'activité hémolytique du complément résiduel pour chaque sérum soumis au T. I. T. , et par conséquent la quantité de la fraction hémolytique complémentaire fixée par le complexe "tréponème-sérum". Les résultats obtenus sont comparés à ceux fournis par le T. I. T. Ainsi une fixation de "complément hémolytique" trouvée identique dans tous les sérums renfermant le même taux d'anticorps immobilisants permettrait de confondre l'effet hémolytique et l'effet immobilisant de l'alexine, ou du moins d'en rendre responsable une fraction identique du complément.

Technique proposée :

Les tubes renfermant le mélange = suspension tréponémique, sérum expertisé et complément qui ont été utilisés pour effectuer le T. I. T. , sont additionnés d'un système hémolytique (suspension d'hématies de mouton + sérum hémolytique de lapin) en quantité convenable). (voir plus loin) .

Après agitation, ils sont placés à 35°C, au bain-marie, et sont examinés toutes les 2 minutes, on note le délai d'apparition de l'hémolyse et son intensité en utilisant la terminologie habituelle :



HO correspondant à une absence d'hémolyse  
H1, H2, H3, à une hémolyse plus ou moins partielle  
H4, à une hémolyse totale

L'expérimentation nous a montré qu'un décalage dans le temps d'apparition de l'hémolyse était souvent observé d'un sérum négatif au T. I. T. à un sérum positif.

L'allongement de ce délai était lié au système hémolytique utilisé. Nous avons donc recherché le système permettant d'obtenir un allongement suffisamment important pour être mesuré, en étudiant l'influence de la concentration globulaire et du taux en sérum hémolytique du système dans cette expérience.

1°) Influence de la concentration en globules rouges du système hémolytique :

Le retard d'apparition de l'hémolyse, observé avec un sérum positif au T. I. T. par rapport à un sérum négatif, a été étudié avec différents systèmes hémolytiques dans lesquels la teneur en sérum hémolytiques dans lesquels la teneur en sérum hémolytique était constante et les concentrations globulaires variables.

Le taux de sérum hémolytique utilisé pour les différentes suspensions globulaires utilisées était du 1/1000, pour un sérum hémolytique renfermant par ml 10 000 unités hémolytiques de la réaction de BORDET-VASSERMANN.

La concentration globulaire a été exprimée en quantité de culot globulaire contenu dans la suspension, le culot était préparé dans les conditions suivantes :

Le sang de mouton, défibriné, était centrifugé une première fois durant 5 minutes à la vitesse de 6000 t/m, le culot globulaire obtenu était remis en suspension dans un même volume d'eau physiologique et récupéré lors d'une seconde centrifugation. 1,0 ml de ce culot globulaire ajouté à 99 ml d'eau physiologique donne ainsi une suspension à 1 % de culot globulaire.

La sensibilisation des systèmes hémolytiques était effectuée par un contact de 30 minutes à 35 °C avant l'exécution de la réaction.

Le temps noté en minutes correspond au délai nécessaire à l'obtention de l'hémolyse totale.





Les résultats obtenus sont condensés dans le tableau suivant N° 17.

TABLEAU N° 17 - Influence de la concentration globulaire du système hémolytique sur le retard de l'hémolyse totale :

| Concentration globulaire du système hémolytique                     | 0,25 % | 0,50% | 1,0% | 2,0% | 4,0% |
|---------------------------------------------------------------------|--------|-------|------|------|------|
| Délai d'apparition de l'hémolyse totale (en minutes)<br>sérum 1 (-) | 6      | 9     | 12   | 13   | 19   |
| sérum 2 (+)                                                         | 8      | 13    | 19   | 23   | 30   |
| Retard de l'hémolyse (en minutes)                                   | 2      | 4     | 7    | 10   | 11   |

Sérum 1 = sérum de sujet non syphilitique présentant un T. I. T. négatif ( 2 % d'I. S. )

Sérum 2 = sérum de sujet syphilitique présentant un T. I. T. positif (100 % d'I. S. )

Un allongement du retard noté dans l'hémolyse apparaît donc avec l'augmentation de la concentration globulaire du système hémolytique.

Cet allongement est exprimé par le graphique N° III.

## 2°) Influence de la teneur en sérum hémolytique du système hémolytique :

Le retard d'apparition de l'hémolyse a été étudié d'une manière identique avec différents systèmes hémolytiques de concentration globulaire constante et de teneur en sérum hémolytique variable.

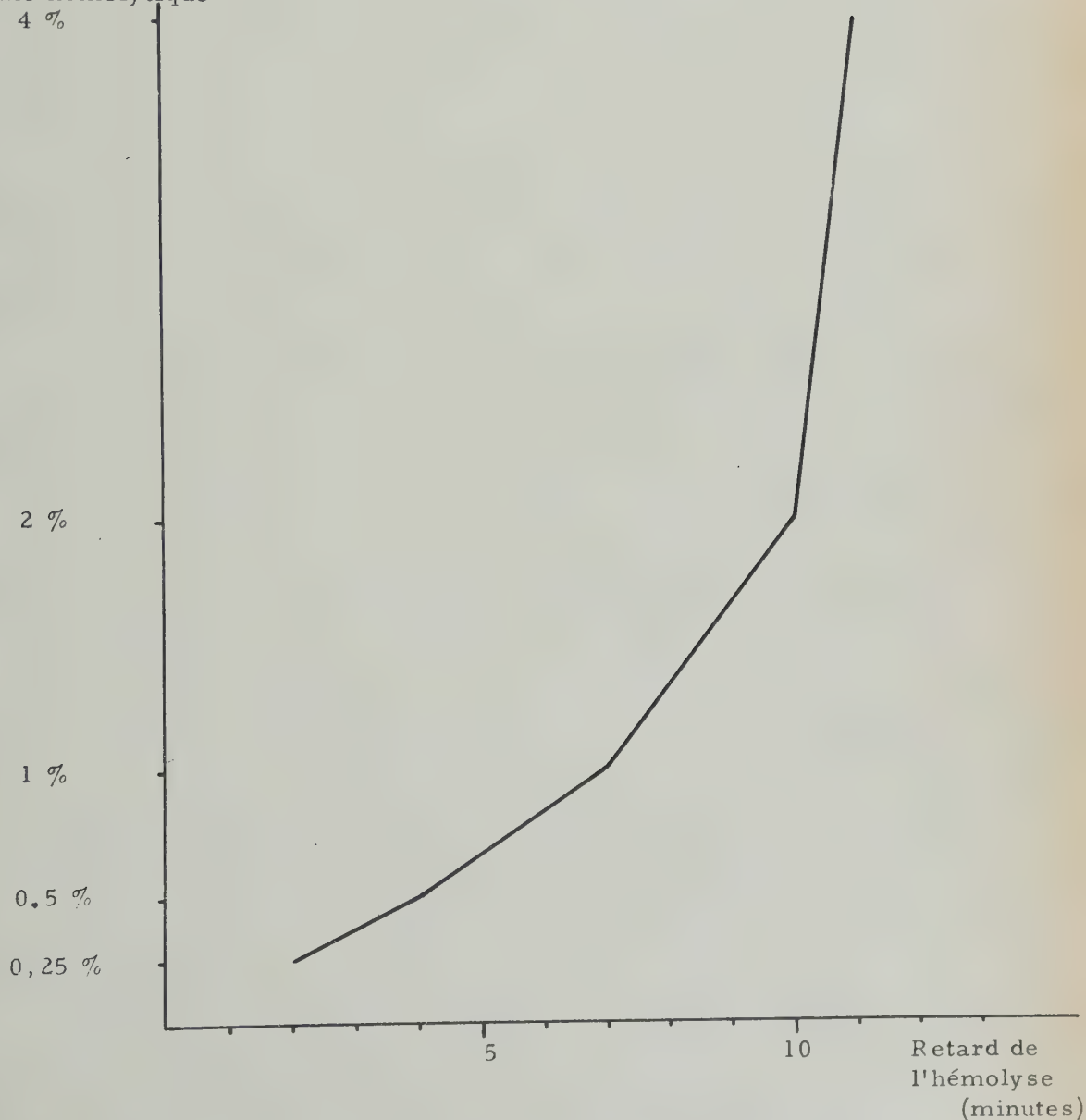
La concentration globulaire constante pour les différentes suspensions utilisées était de 1,0 %, exprimée en culot globulaire.

Le sérum hémolytique employé à différentes dilutions, présentait par ml 10 000 unités hémolytiques de la réaction de BORDET-VAS-SERMANN.





Concentration  
globulaire du  
système hémolytique  
4 ‰



GRAPHIQUE N° III : Variation du retard d'hémolyse en fonction de la concentration globulaire.



Le temps noté en minutes correspond au délai nécessaire à la réalisation de l'hémolyse totale.

Les résultats enregistrés sont notés dans le tableau suivant N° 18.

TABEAU N° 18 - Influence du taux en sérum hémolytique du système hémolytique sur le retard de l'hémolyse totale :

| Taux en sérum hémolytique du système hémolytique     | 1/8000 | 1/4000 | 1/2000 | 1/1000 | 1/500 |
|------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Délai d'apparition de l'hémolyse totale (en minutes) |        |        |        |        |       |
| Sérum 1 (-)                                          | 23     | 16     | 12     | 10     | 6     |
| Sérum 2 (+)                                          | 32     | 27     | 22     | 15     | 9     |
| Retard de l'hémolyse                                 | 11     | 12     | 10     | 5      | 3     |

Un allongement du retard d'hémolyse est donc observé avec la diminution du taux en sérum hémolytique.

Cet allongement est exprimé par le graphique N° IV.

Les résultats de l'étude de ces deux facteurs nous ont fait choisir comme système hémolytique adéquat pour la mesure de la fixation du complément dans le T. I. T. , une suspension de globules rouges dans l'eau physiologique à 2,0 % en culot globulaire, préparée selon la technique indiquée, et renfermant du sérum hémolytique (à 10 000 unités hémolytiques BORDET-VASSERMANN) à la dilution du 1/4000.

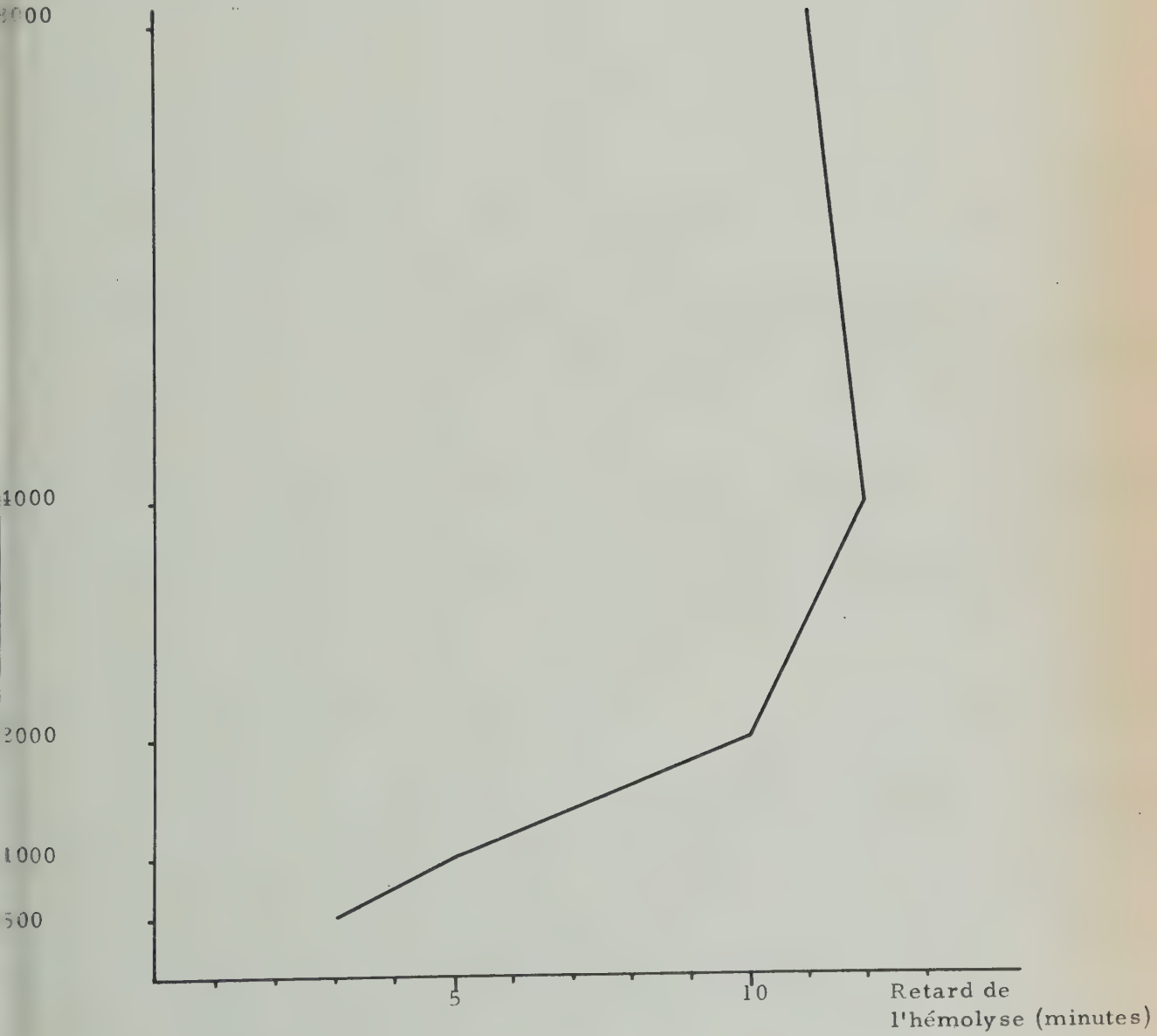
### 3°) Etude de la vitesse de l'hémolyse en fonction du taux d'anticorps immobilisants :

Nous indiquons pour exemple les résultats obtenus en examinant les dilutions croissantes d'un pool (mélange de sérums de syphilitiques riches en anticorps par cette technique.

Après lectures du T. I. T. , les tubes renfermant le mélange : dilution du pool + complément + suspension tréponémique sont additionnés



un en  
système hémolytique  
système hémolytique  
2000



GRAPHIQUE N° IV = Variation du retard d'hémolyse en fonction  
du taux en sérum hémolytique.





d'une suspension d'hématies de mouton à 2,0 % en culot globulaire contenant du sérum hémolytique à une dilution du 1/4000.

Nous avons noté le degré d'hémolyse toutes les 2 minutes après cette addition, en l'exprimant ainsi :

HO = hémolyse nulle

H 1, H2, H3 = hémolyses partielles de plus en plus importantes

H4 = hémolyse totale

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant N° 19.

TABLEAU N° 19 - Vitesse de l'hémolyse en fonction de la quantité d'anticorps immobilisants

| Résultats du<br>T. I. T.<br>(% d'I. S.) | Dilutions<br>du pool       | Temps en minutes |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|-----------------------------------------|----------------------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
|                                         |                            | 2                | 4  | 6  | 8  | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 | 24 | 26 |  |
| 100 %                                   | 1/8                        | HO               | HO | HO | HO | HO | HO | HO | HO | HO | H2 | H2 | H3 | H4 |  |
| 80 %                                    | 1/16                       | HO               | HO | HO | HO | HO | HO | HO | HO | H2 | H2 | H4 |    |    |  |
| 58 %                                    | 1/32                       | HO               | HO | HO | HO | HO | HO | HO | H2 | H3 | H4 |    |    |    |  |
| 27 %                                    | 1/64                       | HO               | HO | HO | HO | HO | H1 | H2 | H4 |    |    |    |    |    |  |
| 6 %                                     | 1/128                      | HO               | H1 | H2 | H2 | H3 | H3 | H4 |    |    |    |    |    |    |  |
| 0 %                                     | Sérum<br>négatif<br>témoin | HO               | H1 | H2 | H3 | H3 | H4 |    |    |    |    |    |    |    |  |

Nous constatons que le retard de l'hémolyse est plus accentué avec les dilutions les moins élevées du pool, et que ce retard d'hémolyse est proportionnel au pourcentage d'immobilisation spécifique. Une plus grande quantité d'immobilisines semble donc fixer une plus grande quantité de "complément hémolytique".

La fraction hémolytique du complément pourrait être alors considérée comme identique à la fraction immobilisante. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons examiné au moyen de cette technique un lot important de sérums variés, en recherchant si la fixation de complément coïncidait toujours avec un T. I. T. positif.

Les résultats sont groupés dans le tableau suivant N°20.



TABLEAU N° 20 - Recherche de la fixation de complément au cours du T. I. T. exécutée sur 200 sérums par la mesure de la vitesse d'hémolyse :

|                                         | Nombre<br>total de<br>sérums | Fixation du<br>complément<br>+ | Fixation du<br>complément<br>- | Concordance de la<br>fixation avec :<br>Sérol. T. I. T.<br>class. |       |
|-----------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------|
| T. I. T. 0-20%<br>Sér. class. -         | 92                           | 4                              | 88                             | 95,6%                                                             | 95,6% |
| T. I. T. 0-20%<br>Sér. class. +         | 2                            | 1                              | 1                              | 50 %                                                              | 50 %  |
| T. I. T. 21-50%<br>Sér. class. -        | 8                            | 3                              | 5                              | 62,5%                                                             | 37,5% |
| T. I. T. 51-99%<br>Sér. class. -        | 14                           | 10                             | 4                              | 28,6%                                                             | 71,4% |
| T. I. T. 51-99%<br>Sér. class. +        | 3                            | 2                              | 1                              | 66,6%                                                             | 66,6% |
| T. I. T. 100%<br>Sér. class. -          | 30                           | 22                             | 8                              | 26,7%                                                             | 73,3% |
| T. I. T. 100%<br>Sér. class. +          | 34                           | 30                             | 4                              | 88,2%                                                             | 88,2% |
| T. I. T.<br>"illible"<br>(Sér. class. - | 13                           | 9                              | 4                              | 30,7%                                                             |       |
| (Sér. class. +                          | 4                            | 4                              |                                | 100 %                                                             |       |

Sér. class. = Sérologie classique

L'examen des résultats portés dans le tableau N° 20 nous montre qu'aucune concordance véritable n'est observée entre la fixation du complément au cours du T. I. T. et le pourcentage d'immobilisation spécifique : ainsi 12 sérums positifs au T. I. T. , avec 100 % d'I. S. , n'ont pas fourni de retard d'hémolyse dans de telles conditions, par contre, une fixation de complément a été enregistrée avec 4 sérums ayant indiqué un T. I. T. négatif.



Nous avons aussi signalé les résultats de l'examen des 200 sérums par la sérologie classique utilisant les antigènes lipidiques. Ils permettent de constater qu'aucune véritable concordance n'est également notée entre la sérologie classique et la fixation de complément au cours du T. I. T.

Les différents résultats obtenus placent la sensibilité de cette réaction comme intermédiaire entre celle de la sérologie classique et celle du T. I. T. Ils ne permettent pas d'invoquer l'intervention des immobilisines, ni celle des réagines dans la fixation de complément par le système = sérum syphilitique + tréponèmes, cette fixation pourrait être alors le fait d'une autre catégorie d'anticorps.

Enfin, ces résultats indiquent surtout la différence d'identité existant entre la fraction du complément à effet immobilisant sur le tréponème et la fraction à effet hémolytique. Les réserves portées sur la valeur du titrage du complément résiduel par un système hémolytique n'en sont donc que renforcées.

L'utilisation de cette technique présente un intérêt certain : elle confirme les résultats du T. I. T. dans 95,6 % des cas pour les sérums négatifs et dans 80,7 % des cas pour les sérums positifs à 100 % d'I. S.

Par contre, elle n'est pas d'une grande utilité pour les sérums tréponémicides, non interprétables de ce fait par le T. I. T. : en effet, les sérums à effet toxique pour le tréponème présentent souvent un retard d'hémolyse beaucoup plus allongé que celui obtenu avec les sérums positifs, dans certains cas, l'hémolyse n'est même plus observée. Un tel phénomène a été remarqué avec 76,6 % des sérums tréponémicides. Il semble donc exister un rapport entre l'activité anti-complémentaire de ces sérums et leur pouvoir tréponémicide.



CHAPITRE V  
=====

REPRODUCTIBILITE DU T. I. T.  
=====





## CHAPITRE V

### REPRODUCTIBILITE DU T. I. T.

Nous venons d'étudier les différents éléments intervenant dans la réalisation du T. I. T. , ceci nous a conduit à formuler des règles précises pour son exécution.

S'il est facile de fixer la dose de sérum à examiner, de réaliser l'anaérobiose, la température et le temps de contact, il n'en est pas de même en ce qui concerne la production de l'orchite, l'époque de prélèvement des tréponèmes, la préparation de la suspension antigénique. Nous avons cependant tenté de préciser ces derniers éléments pour obtenir une plus fidèle reproduction des résultats.

La technique, que nous avons ainsi proposée, entraîne donc une certaine reproductibilité du pourcentage d'immobilisation pour un même taux d'anticorps, comme nous avons pu le vérifier en répétant les examens sur un grand nombre de sérums. Nous avons, chaque fois qu'il a été possible, tenté de trouver une explication aux échecs constatés.

Au cours de ce chapitre, nous communiquons les résultats de cette étude de la reproductibilité de la réaction, et des facteurs qui l'influencent.

#### I) Evaluation de la reproductibilité :

La reproductibilité des résultats a été étudiée à l'aide du matériel suivant :

- 9 pools différents (mélanges de sérums riches en immobilisines),

- 566 sérums sélectionnés, provoquant des immobilisations spécifiques allant de 10 % à 99 % ,



- 500 sérums variés.

Chaque échantillon de sérum a été soumis à 2 examens successifs par le T. I. T. au cours de 2 essais différents, les sérums et les pools étaient conservés à -20°C.

a) Variation de la reproductibilité en fonction du taux d'anticorps :

Nous avons étudié 9 pools au cours de 290 essais, chaque dilution de pool, représentant une quantité constante d'anticorps, a été en moyenne l'objet de 33 déterminations.

Nous indiquons dans le tableau suivant N° 21 les résultats de pourcentage d'I. S. obtenus avec les dilutions 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 d'un même pool, au cours de 27 essais :

TABLEAU N° 21 - Reproductibilité du pourcentage d'immobilisation spécifique (I. S.) pour 5 taux d'anticorps au cours de 27 essais :

| Numéro du protocole : | Pourcentages d'I. S. déterminés par = |                     |                    |                    |                     |                     |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                       | Sérum négatif témoin                  | Pool. dilution 1/16 | Pool dilution 1/32 | Pool dilution 1/64 | Pool dilution 1/128 | Pool dilution 1/256 |
| 1                     | 2                                     | 100                 | 80                 | 52                 | 24                  | 10                  |
| 2                     | 0                                     | 100                 | 88                 | 48                 | 20                  | 12                  |
| 3                     | 0                                     | 100                 | 82                 | 60                 | 32                  | 6                   |
| 4                     | 4                                     | 96                  | 68                 | 36                 | 12                  | 8                   |
| 5                     | 8                                     | 100                 | 84                 | 40                 | 19                  | 5                   |
| 6                     | 2                                     | 100                 | 90                 | 64                 | 28                  | 18                  |
| 7                     | 0                                     | 100                 | 78                 | 58                 | 16                  | 2                   |
| 8                     | 3                                     | 98                  | 74                 | 46                 | 20                  | 8                   |
| 9                     | 0                                     | 100                 | 85                 | 67                 | 38                  | 21                  |
| 10                    | 5                                     | 100                 | 76                 | 50                 | 17                  | 6                   |
| 11                    | 0                                     | 100                 | 89                 | 71                 | 40                  | 26                  |
| 12                    | 1                                     | 100                 | 72                 | 60                 | 25                  | 0                   |
| 13                    | 2                                     | 100                 | 92                 | 80                 | 36                  | 11                  |
| 14                    | 0                                     | 100                 | 81                 | 56                 | 20                  | 18                  |
| 15                    | 6                                     | 100                 | 69                 | 38                 | 29                  | 4                   |
| 16                    | 8                                     | 100                 | 100                | 75                 | 42                  | 22                  |
| 17                    | 4                                     | 100                 | 69                 | 38                 | 30                  | 6                   |
| 18                    | 2                                     | 90                  | 57                 | 32                 | 6                   | 8                   |



TABLEAU N° 21 (Suite)

| Numéro du protocole : | Pourcentages d'I. S. déterminés par = |                    |                    |                    |                     |                     |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                       | Sérum négatif témoin                  | Pool dilution 1/16 | Pool dilution 1/32 | Pool dilution 1/64 | Pool dilution 1/128 | Pool dilution 1/256 |
| 19                    | 7                                     | 100                | 80                 | 48                 | 22                  | 20                  |
| 20                    | 0                                     | 100                | 100                | 81                 | 40                  | 16                  |
| 21                    | 0                                     | 100                | 86                 | 50                 | 18                  | 10                  |
| 22                    | 6                                     | 96                 | 52                 | 33                 | 12                  | 12                  |
| 23                    | 3                                     | 100                | 89                 | 40                 | 41                  | 4                   |
| 24                    | 1                                     | 100                | 68                 | 47                 | 30                  | 15                  |
| 25                    | 0                                     | 98                 | 68                 | 36                 | 14                  | 0                   |
| 26                    | 4                                     | 100                | 65                 | 48                 | 28                  | 10                  |
| 27                    | 0                                     | 100                | 90                 | 54                 | 40                  | 24                  |

Nous avons résumé les résultats du Tableau N° 21 en retenant les valeurs maxima et minima notées pour chaque dilution du pool, afin d'établir l'écart maximum d'immobilisation spécifique pour chaque dilution, ces valeurs sont rassemblées dans le tableau suivant N° 22.

TABLEAU N° 22 - Variation de l'écart maximum de pourcentage d'I. S. en fonction du taux en anticorps, au cours de l'examen répété de dilutions d'un pool :

| Dilutions du pool    | % d'I. S. maximum observé | % d'I. S. minimum observé | Ecart maximum du % d'I. S. |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1/16                 | 100 %                     | 90 %                      | 10                         |
| 1/32                 | 100 %                     | 52 %                      | 48                         |
| 1/64                 | 81 %                      | 32 %                      | 49                         |
| 1/128                | 42 %                      | 6 %                       | 34                         |
| 1/256                | 26 %                      | 0 %                       | 26                         |
| Sérum négatif témoin | 7 %                       | 0 %                       | 7                          |

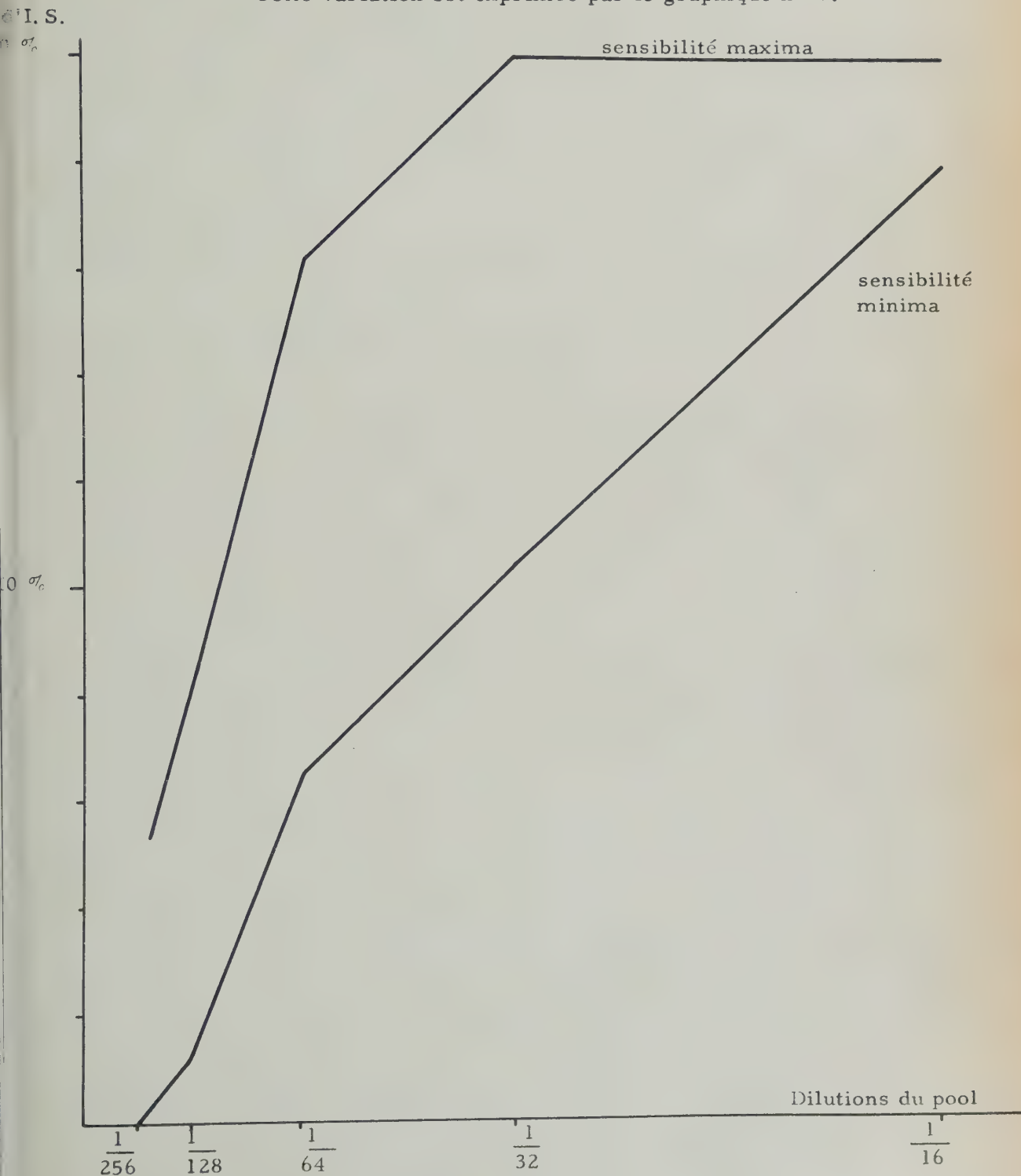
La reproductibilité apparaît donc parfaite avec le sérum négatif témoins, dépourvu d'anticorps, et avec la dilution la plus faible du pool contenant une quantité importante d'anticorps.





L'écart maximum d'immobilisation noté pour un même taux d'anticorps est obtenu avec les dilutions du pool pauvre en anticorps et provoquant des pourcentages d'I. S. partiels.

Cette variation est exprimée par le graphique n° V.



GRAPHIQUE N° V : Variation de la reproductibilité du pourcentage d'I. S. en fonction du taux en anticorps.



b) Etude de la reproductibilité des pourcentages d'I. S. allant de 10 à 99 %.

Nous avons vu que l'immobilisation de 100 % des tréponèmes et l'absence d'immobilisation se reproduisaient très bien alors que la reproductibilité des pourcentages partiels d'immobilisation était beaucoup moins bonne, pour ces raisons, il nous a paru intéressant d'évaluer la reproductibilité du T. I. T. dans les conditions les moins favorables, au moyen d'un lot important de sérums ayant provoqué un pourcentage d'I. S. compris entre 10 et 99 % lors d'un premier test. L'examen de 566 sérums répondant à de telles conditions nous a permis de déterminer la "reproductibilité minima" du T. I. T.

1°) Evaluation de la reproductibilité "minima" suivant les critères de NELSON (98) :

L'interprétation clinique du pourcentage d'I. S. se fait au moyen des critères de NELSON qui sont les suivants :

| % d'I. S.  | Interprétation du résultat   |
|------------|------------------------------|
| 0 à 20 %   | Négatif                      |
| 21 à 50 %  | Douteux (faiblement positif) |
| 51 à 100 % | Positif                      |

La reproductibilité a été considérée comme satisfaisante lorsque deux déterminations du pourcentage d'I. S. plaçaient le sang dans la même catégorie d'interprétation et non satisfaisante lorsqu'il y avait modification de l'interprétation. Nous avons fait en outre une place spéciale aux sérums ayant donné 100 % d'I. S. lors du 2<sup>ème</sup> test car il y avait alors passage d'une immobilisation partielle à une immobilisation totale.

Les résultats obtenus sont condensés dans le tableau suivant N° 23 où est noté le pourcentage de variation enregistré pour chaque éventualité de changement d'interprétation et pour les interprétations demeurées identiques :



TABLEAU N° 23 - Evaluation de la reproductibilité des résultats de 566 sérums ayant provoqué un % d'I. S. de 10 à 99 % dans un premier test, suivant le critère de NELSON :

| Variation des indications<br>obtenues de $\longrightarrow$ à | Nombre de sérums | Pourcentage |
|--------------------------------------------------------------|------------------|-------------|
| Indications demeurées<br>identiques                          | 420              | 74,23 %     |
| Négatif      Douteux                                         | 88               | 15,38 %     |
| Négatif      Positif                                         | 9                | 1,68 %      |
| Négatif      100 %                                           | 1                | 0,17 %      |
| Douteux      Positif                                         | 20               | 3,53 %      |
| Douteux      100 %                                           | 1                | 0,17 %      |
| Positif      100 %                                           | 27               | 4,83 %      |

La reproductibilité des résultats, suivant leur interprétation, n'apparaît pas très satisfaisante, puisque près de 25 % de ces sérums ont donné lieu à une interprétation différente après un 2<sup>ème</sup> test. En fait, cette classification suivant les critères de NELSON ne traduit pas fidèlement la reproductibilité : par exemple, un sérum indiquant une I. S. de 18 % dans un 1<sup>er</sup> test, puis de 22 % dans un 2<sup>ème</sup> test est classé comme négatif devenant douteux, et la reproductibilité est ainsi jugée non satisfaisante pour une différence d'I. S. de 4 %, par contre un sérum dont le pourcentage d'I. S. passe de 52 % à 96 % reste dans la même catégorie d'interprétation et la reproductibilité est jugée satisfaisante pour une différence d'immobilisation de 44 %.

C'est pourquoi la reproductibilité a été évaluée en déterminant l'élévation ou l'abaissement du pourcentage d'I. S. d'un résultat à l'autre.

## 2°) Evaluation de la reproductibilité "minima" du T. I. T. en fonction de l'élévation du pourcentage d'I. S. :

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau suivant N° 24 en fonction de la différence des pourcentages d'I. S. déterminés par les 2 essais.



TABLEAU N° 24 - Evaluation de la reproductibilité des résultats de 566 sérums, suivant la différence des % d'I. S. déterminés au cours de 2 essais différents :

| Différence du % d'I. S. entre les 2 mesures. | Nombre de sérums | Pourcentage |
|----------------------------------------------|------------------|-------------|
| de 0 à 10 %                                  | 349              | 61,69 %     |
| de 11 à 20 %                                 | 170              | 30,03 %     |
| de 21 à 30 %                                 | 29               | 5,12 %      |
| de 31 à 40 %                                 | 11               | 1,94 %      |
| de 41 à 50 %                                 | 3                | 0,53 %      |
| de 51 à 60 %                                 | 2                | 0,35 %      |
| de 61 à 70 %                                 | 1                | 0,17 %      |
| de 71 à 80 %                                 |                  |             |
| de 81 à 90 %                                 | 1                | 0,17 %      |
| de 91 à 100 %                                |                  |             |

Une différence de pourcentage d'I. S. inférieure à 20 % est donc obtenue dans 91,72 % des contrôles des immobilisations comprises entre 10 et 99 %. La valeur du pourcentage d'I. S. est donnée dans cette catégorie de sérums à une précision de plus ou moins 10 %, précision suffisante pour l'utilisation clinique des résultats.

c) Etude de la reproductibilité des résultats de 500 sérums variés :

Ces sérums ont été groupés au fur et à mesure de leur arrivée au laboratoire, ils ont chacun été soumis à 2 mesures du T. I. T. , pratiquées au cours de 2 séries différentes. La reproductibilité évaluée à l'aide de ce matériel est donc celle réalisée dans les conditions habituelles de pratique du T. I. T. Elle a été exprimée en utilisant les critères de NELSON, selon le procédé employé plus haut pour le lot de sérums sélectionnés ayant provoqué des pourcentages d'I. S. allant de 10 à 99 %.

Les résultats sont groupés dans le tableau suivant N° 25.





TABLEAU N° 25 - Evaluation de la reproductibilité des résultats de T. I. T. de 500 sérums variés suivant le critère de NELSON :

| Variation des indications<br>obtenues de —————→à | Nombre de sérums | Pourcentage |
|--------------------------------------------------|------------------|-------------|
| Indications demeurées<br>identiques              | 476              | 95,20 %     |
| Négatif —————→Douteux                            | 6                | 1,20 %      |
| Négatif —————→Positif                            | 1                | 0,20 %      |
| Négatif —————→100 %                              |                  |             |
| Douteux —————→Positif                            | 10               | 2,00 %      |
| Douteux —————→100 %                              |                  |             |
| Positif —————→100 %                              | 7                | 1,40 %      |

Nous voyons que dans les conditions habituelles de pratique courante du T. I. T. , où l'on teste une grande majorité de sérums négatifs ou positifs avec 100 % d'I. S. , la reproductibilité globale des résultats est de 95,20 %.

## II) Tentative d'explication des déficiences de la reproductibilité.

Nous avons recherché les origines de cette déficience de la reproductibilité des pourcentages "partiels" d'I. S. dans les causes éventuelles suivantes :

### a) Lyse des tréponèmes :

LEBOEUF (74) a signalé que la lyse des tréponèmes peut être une cause d'erreur dans le T. I. T. En effet, une lyse plus ou moins grande est observée dans les tubes renfermant des sérums positifs à 100 % d'I. S. et le complément actif, la densité tréponémique se trouve de ce fait abaissée.

On peut supposer que ce phénomène se produit également dans des tubes renfermant des faibles quantités d'anticorps (immobilisation spécifique comprise entre 21 et 99 %). Les tréponèmes lysés échappent à la lecture et le rapport entre tréponèmes mobiles et tréponèmes immobiles est ainsi faussé et le pourcentage d'I. S. diminué. En outre, l'éventualité d'un rôle antigénique des "tréponèmes solubilisés" par blocage d'anticorps immobilisants a également été invoquée par NIELSEN (101).



b) Développement d'anticorps tréponémiques chez le lapin et sensibilisation des tréponèmes par ces anticorps au cours de l'évolution de l'orchite :

Les tréponèmes injectés dans les testicules de lapin vont, en se multipliant, provoquer une orchite et l'apparition d'anticorps dans le sang. Le taux de ces anticorps s'élèvera progressivement et le sang de l'animal examiné avec le T. I. T. montrera alors la présence d'immobilisines.

Les anticorps développés pourraient être susceptibles soit de contribuer à la destruction d'une partie des tréponèmes, soit de les "sensibiliser". Dans ce dernier cas, les spirochètes conserveraient leur vitalité mais s'immobiliseraient spontanément dès qu'ils sont mis en présence de complément, lors de l'exécution du T. I. T.

La réponse immunologique du lapin à, l'inoculation intra-testiculaire de *Treponema pallidum* semble donc pouvoir jouer un rôle important dans la reproductibilité des résultats. Elle peut être étudiée en recherchant les anticorps dans le sang de l'animal. La non apparition de ces anticorps ne signifiera pas pour autant l'absence d'un processus immunologique local déjà apparu dans le testicule syphilité et qu'il sera plus difficile de mettre en évidence.

1°) Réponse immunologique, observée dans le sang du lapin à la suite de l'inoculation de *Treponema pallidum* :

Lorsqu'une inoculation intra-testiculaire a été pratiquée chez le lapin, on observe les faits suivants = après 5 à 8 jours, apparaît une orchite précoce et aiguë intéressant les testicules et dont l'utilisation pour la réalisation du T. I. T. est alors possible (ce stade est caractéristique de la souche NICHOLS).

Après 15 à 30 jours, on observe une lésion syphilomateuse de 0,5 à 1 cm de diamètre sur le tégument scrotal de chaque testicule (seule réponse ordinaire aux inoculations effectuées avec d'autres souches de *Treponema pallidum*), ces lésions régressent ensuite spontanément et disparaissent après 1 à 2 mois.

Selon GASTINEL (47), une syphilis généralisée n'est observée que très rarement, et dans nos recherches nous ne l'avons jamais rencontrée. La plupart du temps, l'orchite aura constitué à elle seule "la syphilis du lapin".



Nous avons étudié les modalités d'apparition des anticorps au cours de l'infection tréponémique du lapin, en pratiquant des T. I. T. sur les sérums sanguins de 144 lapins syphilités par inoculation intra-testiculaire et prélevés à des temps variables après l'inoculation.

La formation d'anticorps immobilisants après l'introduction des tréponèmes dans l'organisme du lapin, n'est décelable par le T. I. T. que vers le 14<sup>ème</sup> jour pour FRIBOURG-BLANC (43), à partir du 20<sup>ème</sup> jour selon GASTINEL (48) et du 40<sup>ème</sup> jour suivant LEVADITI, VAISMAN et HAMELIN (78).

Dans nos recherches, nous avons observé qu'en fait les résultats donnés par le T. I. T. sont très variables du lapin à l'autre. C'est ainsi que les pourcentages d'I. S. déterminés par les sérums prélevés chez 5 lapins différents, 11 jours après l'inoculation ont été les suivants :

| Sérum de lapin : | % d'I. S. : |
|------------------|-------------|
| N° 245           | 0 %         |
| N° 229           | 29 %        |
| N° 427           | 32 %        |
| N° 302           | 70 %        |
| N° 256           | 100 %       |

L'examen de ces résultats nous montre que 11 jours après l'inoculation, le sérum de lapin examiné par le T. I. T. peut donner un résultat variant de 0 % à 100 %. Il s'agit cependant de cas extrêmes de variation.

En testant le sang de nombreux animaux syphilités, nous avons pu déterminer, par moyenne des résultats enregistrés, le "pourcentage moyen d'I. S. " du sang du lapin pour chaque jour suivant son inoculation. L'évolution de ce pourcentage avec l'infection tréponémique peut être ainsi étudiée.

Nous indiquons dans le tableau suivant N° 26, les différents "pourcentages moyens d'I. S. " obtenus, en fonction du nombre de jours écoulé entre la date où l'inoculation a eu lieu (heure 0) et celle où a été effectuée la ponction sanguine.







TABLEAU N° 26 - Evolution du T. I. T. dans le sang du lapin inoculé par voie intra-testiculaire avec *Treponema pallidum*-NI-CHOLS.

| Délai écoulé (exprimé en jours) entre la date de l'inoculation et celle du prélèvement de sang : | % "moyens" d'I. S. | Nombre de prélèvements examinés : |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 1 à 5 jours                                                                                      | 3 %                | 8                                 |
| 6                                                                                                | 12 %               | 12                                |
| 7                                                                                                | 11 %               | 20                                |
| 8                                                                                                | 15 %               | 20                                |
| 9                                                                                                | 14 %               | 11                                |
| 10                                                                                               | 16 %               | 5                                 |
| 11                                                                                               | 30 %               | 9                                 |
| 12                                                                                               | 33 %               | 5                                 |
| 13                                                                                               | 30 %               | 4                                 |
| 14                                                                                               | 53 %               | 6                                 |
| 15 à 20                                                                                          | 52 %               | 5                                 |
| 21 à 30                                                                                          | 48 %               | 4                                 |
| 31 à 40                                                                                          | 59 %               | 6                                 |
| 40 à 50                                                                                          | 68 %               | 4                                 |
| 50 à 90                                                                                          | 90 %               | 4                                 |
| 92                                                                                               | 100 %              | 1                                 |
| 114                                                                                              | 100 %              | 1                                 |
| 160                                                                                              | 100 %              | 1                                 |
| 224                                                                                              | 100 %              | 1                                 |
| 280                                                                                              | 84 %               | 1                                 |
| 324                                                                                              | 100 %              | 1                                 |

Les résultats du Tableau N° 26 donnent une indication permettant de suivre la progression du développement des immobilisines chez le lapin inoculé. Ils montrent que l'élévation du pourcentage d'I. S. ne commence à être significative qu'à partir du 10<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation. On peut considérer que, dans les 10 premiers jours suivant l'inoculation, le sang du lapin est pratiquement dépourvu d'anticorps immobilisants. Il sera de règle dans la pratique du T. I. T. , d'utiliser les testicules d'un animal syphilitisé avant l'expiration de ce délai.

Au cours de ces essais, 21 sérums de lapin se sont révélé-



lés toxiques pour le tréponème et n'ont pu fournir de T. I. T. valable. Leur pouvoir tréponémicide était partiel ou total. Cette relative fréquence (15 %) de l'existence d'une activité toxique du sérum de lapin syphilité pour le tréponème, est un peu plus faible pour le sérum de lapin sain (10 %), nous n'avons pu en établir les causes.

Nous avons étudié également la vitesse d'apparition des réagines mises en évidence par les méthodes de la sérologie classique, dans le sang de ces mêmes animaux infectés par *Treponema pallidum*. Des réactions d'hémolyse (DEMANCHE) et de floculation (V. D. R. L., KAHN, MEINICKE-clarification et MEINICKE-opacification) ont été pratiquées sur les sangs prélevés aux différentes dates de l'infection tréponémique du lapin.

Les résultats ainsi obtenus sont indiqués dans le tableau suivant N° 27 de la manière suivante : pour chaque jour suivant l'inoculation, le pourcentage de réactions trouvées positives a été déterminé à partir des résultats de l'examen de nombreux prélèvements.

TABLEAU N° 27 - Evolution de la sérologie classique dans le sang du lapin inoculé par voie intra-testiculaire avec *Treponema pallidum*-NICHOLS :

| Délai écoulé entre la date de l'inoculation et celle du prélèvement de sang (exprimé en jour) | Pourcentage de réactions trouvées positives totales |      |                |                |            |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------|----------------|----------------|------------|-----|
|                                                                                               | V. D. R. L.                                         | Kahn | Meinicke Clar. | Meinicke Opac. | Demanche + | ++  |
| 2                                                                                             | 10 %                                                | 20 % | 0 %            | 5 %            | 0 %        | 0 % |
| 3                                                                                             | 34                                                  | 46   | 16             | 12             | 12         | 0   |
| 4                                                                                             | 58                                                  | 60   | 40             | 46             | 30         | 16  |
| 5                                                                                             | 82                                                  | 80   | 74             | 80             | 60         | 22  |
| 6                                                                                             | 80                                                  | 84   | 88             | 88             | 52         | 38  |
| 7                                                                                             | 90                                                  | 82   | 76             | 88             | 25         | 64  |
| 8                                                                                             | 92                                                  | 80   | 84             | 90             | 22         | 70  |
| 9                                                                                             | 88                                                  | 84   | 86             | 90             | 16         | 76  |
| 10                                                                                            | 100                                                 | 100  | 94             | 100            | 18         | 82  |
| 11                                                                                            | 94                                                  | 100  | 100            | 100            | 10         | 90  |
| 12                                                                                            | 100                                                 | 92   | 100            | 100            |            | 100 |

A partir du 12 ème jour, les réactions sont toutes trouvées positives dans 100 % des sérums examinés.



Ces résultats permettent de remarquer une apparition beaucoup plus rapide des réagines que des immobilisines dans le sang du lapin infecté. Les réagines sont déjà décelées dès le 3<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation, principalement par les réactions de floculation utilisées, elles apparaissent dans le cas le plus général au 5<sup>ème</sup> jour et à cette date, les réactions de floculation montrent une forte positivité.

Nous remarquerons que la réaction de KAHN est généralement la plus précoce et que la réaction de DEMANCHE apparaît positive avec un léger retard par rapport aux autres réactions, ce retard n'est d'ailleurs pas caractéristique des réactions d'hémolyse, car la réaction d'hémolyse de KOLMER, que nous avons pratiquée sur un nombre plus réduit de sérums, s'est révélée aussi précoce que la réaction de KAHN.

Enfin, nous signalerons qu'une relative fréquence du pouvoir anticomplémentaire est observée dans le sérum de lapin (17 %), souvent cette activité est notée avec des sérums tréponémicides, donc non interprétables par le T. I. T., sans qu'un tel phénomène puisse être expliqué.

Les résultats fournis par la sérologie classique nous permettent de conclure à une rapidité de la réponse humorale du lapin inoculé par *Treponema pallidum*-NICHOLS. Bien que les réagines ne soient pas considérées comme de véritables anticorps tréponémiques, leur apparition accélérée dans le sang du lapin n'en traduit pas moins une réponse de l'organisme de l'animal à l'infection.

## 2°) Réponse immunologique locale du lapin à l'inoculation :

L'apparition d'anticorps immobilisants dans le sang du lapin au cours de l'évolution de l'orchite syphilitique ne semble donc pas se produire en quantité suffisante dans les délais d'utilisation des testicules pour exercer une action défavorable sur les résultats du T. I. T.

Nous nous sommes demandés si cependant un processus immunologique ne s'installerait pas localement de manière plus précoce.

YOSHIDA en 1930 (174) avait émis l'hypothèse que, dans la syphilis, une immunité tissulaire d'abord circonscrite et régionale s'étendrait progressivement ensuite, GASTINEL et ses collaborateurs en 1934 (49) ont constaté l'existence de phénomènes d'immunité locale en pratiquant une 1<sup>ère</sup> inoculation sous-scrotales et unilatérale avec un greffon riche en tréponèmes, puis en effectuant une réinoculation bilatérale postérieure. Ils ne constatèrent aucune nouvelle manifestation sur





le testicule où avait eu lieu la 1<sup>ère</sup> insertion, tandis qu'un syphilome caractéristique apparaissait sur le 2<sup>ème</sup> testicule "neuf". Plus récemment, la présence d'anticorps immobilisants a été mise en évidence dans le liquide de bulles provoquées expérimentalement chez l'homme à l'emplacement présumé de l'inoculation, en employant des préparations à base de cantharides (132). Cette réaction permettrait un séro-diagnostic plus précoce de la syphilis et mettrait en évidence le caractère local du processus immunologique au début de cette affection. En effet, les liquides de bulles provoquées sur d'autres régions du corps ne montrèrent que plus tardivement la présence d'immobilisines dont le taux reste inférieur à celui constaté dans le sang, mais dont la courbe évolutive est parallèle à celle des immobilisines observées dans le sang.

Afin d'examiner si un tel phénomène local pouvait intervenir lors de l'évolution de l'orchite syphilitique aigue du lapin, nous avons tenté de mettre en évidence une production d'anticorps "in situ". Dans ce but, nous avons recherché la présence d'immobilisines dans le suc testiculaire de ces orchites en utilisant le T. I. T. : La technique adoptée était la suivante :

Les testicules isolés et dilacérés étaient additionnés de 1,0 ml d'eau physiologique et placés 10 minutes à 35°C en anaérobiose, le liquide extractif obtenu était à la fois riche en suc testiculaire (50 à 80 %) et en tréponèmes, sa richesse tréponémique était mesurée à l'ultra-microscope, les testicules ayant servi à sa préparation, encore riches en tréponèmes après ce semi-épuisement, étaient utilisés pour la préparation de la suspension antigénique du T. I. T., la suspension antigénique (milieu, de survie + tréponèmes) était remplacée par du milieu pur dans les tubes où étaient placés l'extrait testiculaire =

|                      | Tube 1 (réaction) | Tube 2 (témoin) |
|----------------------|-------------------|-----------------|
| Liquide testiculaire | 0,05 ml           | 0,05 ml         |
| Complément actif     | 0,15 ml           |                 |
| Complément inactivé  |                   | 0,15 ml         |
| Milieu de survie     | 0,35 ml           | 0,35 ml         |

La dilution au 1/10 du suc testiculaire dans le milieu de survie et le complément entraînaient généralement une densité tréponémique de l'ensemble du mélange voisine de celle réalisée avec la suspension antigénique dans les autres tubes du protocole (5 à 10 tréponèmes par champ microscopique).

Le liquide testiculaire ainsi préparé ne contient que quel-





ques traces de complément qui n'interviennent pratiquement pas dans le tube témoin.

Un prélèvement du sang du lapin a été pratiqué immédiatement après le sacrifice de l'animal, précédant l'emploi de ses testicules syphilités pour la réalisation de l'essai, le sérum sanguin ainsi prélevé était soumis au T. I. T. en même temps que le suc testiculaire et avec des tréponèmes de même origine.

Les différents pourcentages d'I. S. obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant N° 28, où il nous a semblé intéressant de noter l'âge de l'orchite au jour des prélèvements, par rapport à la date d'inoculation du lapin et à celle de l'apparition des premiers signes de l'orchite, en effet, dans la pratique du T. I. T., on a l'habitude d'utiliser ces premiers signes pour déterminer le moment favorable à l'utilisation des testicules,

TABLEAU N° 28 - Apparition des immobilisines dans le sang et dans le suc testiculaire du lapin inoculé par voie intratesticulaire avec *Treponema-pallidum*-NICHOLS :

| Age de l'orchite<br>(par rapport à<br>la date d'inocula-<br>tion du lapin) | Age de l'orchite<br>(par rapport à sa<br>date d'apparition) | % d'I. S.<br>- sang | % d'I. S.<br>- suc testi-<br>culaire |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| 7 jours                                                                    | 1 jour                                                      | 2 %                 | 18 %                                 |
| 6                                                                          | 1                                                           | 26 %                | 28 %                                 |
| 7                                                                          | 2                                                           | 8 %                 | 60 %                                 |
| 7                                                                          | 2                                                           | 16 %                | 28 %                                 |
| 8                                                                          | 2                                                           | 10 %                | 22 %                                 |
| 8                                                                          | 2                                                           | 10 %                | 34 %                                 |
| 9                                                                          | 2                                                           | 18 %                | 45 %                                 |
| 8                                                                          | 3                                                           | 14 %                | 30 %                                 |
| 10                                                                         | 3                                                           | 20 %                | 42 %                                 |
| 10                                                                         | 4                                                           | 11 %                | 56 %                                 |
| 12                                                                         | 4                                                           | 25 %                | 68 %                                 |
| 12                                                                         | 5                                                           | 30 %                | 47 %                                 |
| 13                                                                         | 6                                                           | 24 %                | 60 %                                 |

Les résultats n'ont été retenus que pour les essais n'ayant pas montré de sensibilisation des tréponèmes, c'est-à-dire d'immobilisa-



tion spontanée des tréponèmes en présence de complément et sans anticorps, ainsi sur 3 essais pratiqués avec des orchites utilisées 6 jours après l'apparition des premiers signes, un seul a pu être retenu, car à cette date le phénomène de sensibilisation des tréponèmes devient très fréquent.

Les résultats indiqués dans ce tableau N° 28 montrent nettement que l'apparition des immobilisines est plus précoce dans le suc testiculaire que dans le sang au cours de l'évolution de l'orchite syphilitique du lapin. De ces recherches, il résulte donc qu'au début de l'apparition de l'orchite, il y a production d'anticorps immobilisants dans le testicule. Les faibles pourcentages d'I. S. trouvés dans le suc testiculaire révèlent cependant qu'il ne s'agit que de traces de ces anticorps. Leur taux semble s'élever progressivement au fur et à mesure de l'évolution de l'orchite. Les teneurs en immobilisines trouvées nettement inférieures dans le sang tendent à montrer le caractère local du phénomène immunologique.

Cette évolution parallèle du taux en anticorps immobilisants dans le testicule et dans le sang du lapin syphilitisé a été exprimée dans le graphique suivant N° VI qui a été construit à l'aide des moyennes des résultats trouvés pour chaque jour suivant l'apparition des premiers signes de l'orchite.

La conséquence pratique, que nous pouvons déduire de ces observations, est la nécessité de réduire au maximum le passage dans la suspension antigénique de suc testiculaire, celui-ci étant susceptible d'apporter des immobilisines et d'influencer, par conséquent, la réaction et d'en compromettre sa reproductibilité.

Enfin, nous signalerons que la richesse en réagines du sang est apparue sans rapports avec le taux des anticorps immobilisants trouvés dans le testicule.

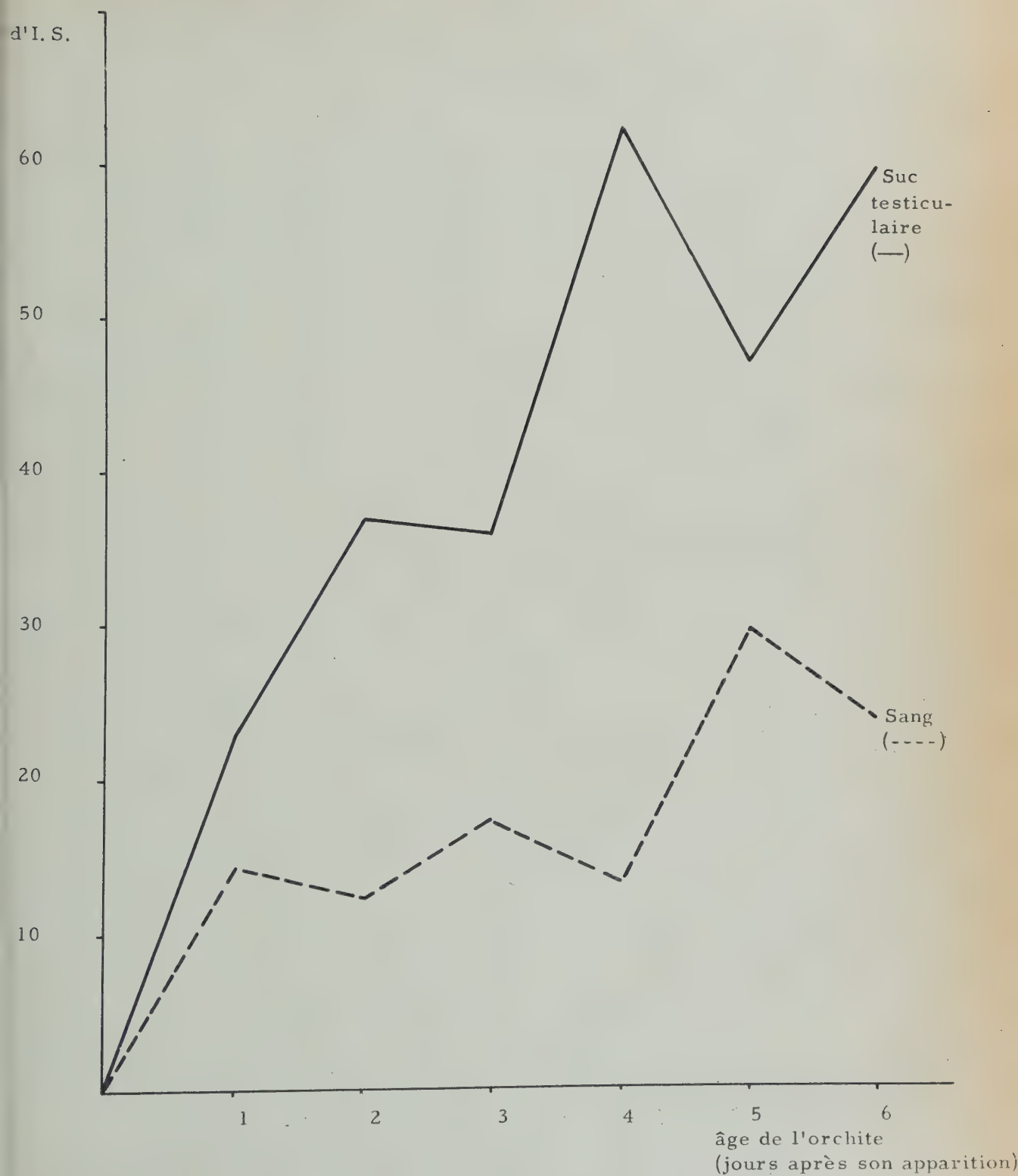
### 3°) Phénomène de sensibilisation des tréponèmes au cours de l'évolution de l'orchite syphilitique du lapin :

Le phénomène de sensibilisation peut se définir ainsi :

- Les anticorps élaborés par le lapin en réponse à l'infection tréponémique se fixeraient sur un certain nombre des tréponèmes sans toutefois affecter leur vitalité "in vivo", dans le testicule ,

- Au cours de l'exécution du T. I. T. , les tréponèmes





GRAPHIQUE N° VI : Développement d'anticorps immobilisants dans le testicule et dans le sang du lapin au cours de l'évolution de son orchite aiguë syphilitique.





TABLEAU N° 29 - Résultats de T. I. T. obtenus avec un protocole normal et un protocole exécuté avec des tréponèmes sensibilisés :

| PRELEVEMENT<br>EXAMINE                   | PROTOCOLE NOR-<br>MAL |                        |              | PROTOCOLE exécuté<br>avec des tréponèmes<br>sensibilisés |                        |              | ELEVA-<br>TION du<br>% d'I. S. |
|------------------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------|----------------------------------------------------------|------------------------|--------------|--------------------------------|
|                                          | TP/50<br>Témoin       | TP/50<br>Réac-<br>tion | %<br>d'I. S. | TP/50<br>Témoin                                          | TP/50<br>Réac-<br>tion | %<br>d'I. S. |                                |
| Sérum N° 1                               | 48                    | 46                     | 4 %          | 48                                                       | 40                     | 17%          | 13                             |
| Sérum N° 2                               | 48                    | 20                     | 58 %         | 50                                                       | 13                     | 74%          | 16                             |
| Sérum N° 3                               | 50                    | 49                     | 2 %          | 46                                                       | 41                     | 11%          | 9                              |
| Sérum N° 4                               | 48                    | 45                     | 6 %          | 46                                                       | 39                     | 15%          | 9                              |
| Sérum N° 5                               | 50                    | 50                     | 0 %          | 48                                                       | 40                     | 17%          | 17                             |
| Sérum N° 6                               | 48                    | 18                     | 62 %         | 44                                                       | 4                      | 91%          | 29                             |
| Sérum N° 7                               | 46                    | 5                      | 89 %         | 48                                                       | 0                      | 100%         | 11                             |
| Sérum N° 8                               | 48                    | 0                      | 100 %        | 44                                                       | 0                      | 100%         | 0                              |
| Témoin positif :<br>Dilutions du<br>pool |                       |                        |              |                                                          |                        |              |                                |
| 1/16                                     | 46                    | 0                      | 100%         | 48                                                       | 0                      | 100%         | 0                              |
| 1/32                                     |                       | 18                     | 61%          |                                                          | 0                      | 100%         | 39                             |
| 1/64                                     |                       | 32                     | 30%          |                                                          | 25                     | 48%          | 18                             |
| 1/128                                    |                       | 40                     | 13%          |                                                          | 36                     | 25%          | 12                             |
| 1/256                                    |                       | 44                     | 4%           |                                                          | 41                     | 15%          | 11                             |

TP/50 = Treponema pallidum mobiles sur 50 Témoin dans le tube témoin (complément inactivé).

TP/50 = Treponema pallidum mobiles sur 50 Réaction dans le tube à réaction (complément actif).

Nous avons cherché à préciser le mécanisme de cette "sensibilisation" des tréponèmes.

Dans le cas d'une 1 ère phase de la sensibilisation consistant en la fixation des anticorps du lapin sur le tréponème dans le testicule, la 2 ème phase, consistant en l'immobilisation in vitro des trépo-



nèmes sensibilisés par leur mise en contact avec du complément, devrait être assez rapide : en effet, lorsque l'on étudie en fonction du temps de contact, la vitesse d'immobilisation de tréponèmes, non sensibilisés, par les immobilisines, on constate que l'immobilisation ne commence qu'après un temps de contact allant de 5 à 10 heures, cette immobilisation se ferait en 2 temps : il y aurait d'abord fixation de l'anticorps sur le tréponème, puis ensuite immobilisation du germe, l'intervention du complément dans cette réaction se place à la fin du 1<sup>er</sup> temps et elle est très rapide comme l'ont signalé DAGUET, MAYER, BARRON et SELDEEN (22), ces auteurs mettaient en contact, pendant un temps variable allant de 18 à 24 heures, des tréponèmes avec des anticorps immobilisants, et ajoutaient le complément après cette "présensibilisation", dans ces conditions, le pourcentage d'immobilisation des tréponèmes déterminé dans les heures suivantes atteignait une valeur presque maxima dès la 2<sup>ème</sup> heure.

Si les tréponèmes sont sensibilisés in vivo par les anticorps du lapin, la fixation des immobilisines sur le germe a déjà eu lieu lorsque l'on pratique la réaction du T. I. T., l'immobilisation des tréponèmes devrait alors s'effectuer très rapidement, dès la mise en présence du complément.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des T. I. T. avec des tréponèmes présumés sensibilisés qui provenaient d'orchites utilisées 5 à 6 jours après l'apparition des premiers signes et qui étaient mis en présence avec des sérums connus. Les pourcentages d'immobilisation ont été déterminés après 2, 4, 8, 18, 22 et 24 heures de contact. Les résultats ainsi obtenus sont indiqués dans le tableau N° 30, l'essai a été exécuté avec des tréponèmes provenant d'une orchite utilisée 6 jours après l'apparition de ses premiers signes, alors que le lapin était inoculé depuis 13 jours. Nous signalons également les pourcentages d'I. S. provoqués par les mêmes sérums dans un essai normal en utilisant des tréponèmes non sensibilisés.



TABLEAU N° 30 - Cinétique de l'immobilisation de tréponèmes sensibilisés (% d'I. S. déterminés après un temps de contact variable avec différents sérums)

|             | PROTOCOLE exécuté avec des tréponèmes sensibilisés<br>% d'I. S. après = |     |     |      |      |      | PROTOCOLE NORMAL %d'I. S. |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|---------------------------|
|             | 2h.                                                                     | 4h. | 8h. | 18h. | 22h. | 24h. | après 22h.                |
| Sérum N° 1  | 0%                                                                      | 0%  | 0%  | 12%  | 16%  | 18%  | 4%                        |
| Sérum N° 2  | 4                                                                       | 4   | 6   | 18   | 18   | 18   | 0                         |
| Sérum N° 3  | 0                                                                       | 2   | 4   | 12   | 15   | 17   | 2                         |
| Sérum N° 4  | 2                                                                       | 2   | 8   | 16   | 18   | 20   | 0                         |
| Sérum N° 55 | 0                                                                       | 6   | 20  | 50   | 51   | 56   | 36                        |
| Sérum N° 6  | 2                                                                       | 4   | 24  | 58   | 68   | 68   | 37                        |

Nous constatons donc que l'immobilisation des tréponèmes n'a pas encore véritablement commencé après 8 heures de contact et qu'elle n'atteint sa valeur maxima qu'après 22 heures.

Il apparait de ce fait, que le complément n'est pas l'unique facteur de l'immobilisation in vitro des tréponèmes sensibilisés in vivo, étant donné le temps appréciable de contact nécessaire avant l'immobilisation, alors que les tréponèmes ayant fixé l'anticorps immobilisant sont immobilisés en 2 heures après mise en contact avec de l'alexine.

Trois hypothèses nous ont alors parues possibles pour expliquer le mécanisme de la sensibilisation des tréponèmes :

a) La fixation in vivo des anticorps sur le tréponème ne s'effectuerait pas selon un mode identique à celle réalisée in vitro dans le T. I. T. Cette différence de fixation de l'anticorps sur l'antigène nécessiterait un temps d'action du complément beaucoup plus long pour déterminer l'immobilisation.

b) Une altération de la vitalité des tréponèmes débiterait dans le testicule sous l'action des anticorps et de l'alexine du lapin, le complément, ajouté en excès lors de l'exécution du T. I. T. , accélérerait alors l'immobilisation esquissée dans l'organisme animal, dans certains cas, sa présence ne serait même plus indispensables, le temps de contact, suffirait à terminer cette immobilisation, ceci expliquerait la mauvaise





survie générale, dans les tubes à complément actif et dans les tubes à complément inactif, observée assez souvent en utilisant des tréponèmes provenant d'orchites vieilles.

c) Il n'y aurait pas de "sensibilisation" des tréponèmes, les anticorps ne se fixeraient pas sur les germes et resteraient libres dans le milieu testiculaire, leur passage dans la suspension antigénique lors de l'extraction est inévitable, et ces traces d'anticorps ainsi véhiculées et distribuées dans les tubes avec la suspension tréponémique provoqueraient l'immobilisation d'un certain nombre de tréponèmes, en présence de complément actif.

Nous avons établi qu'une formation progressive d'immobilisines avait lieu dans le testicule, lors de l'évolution de l'orchite syphilitique. Afin de déterminer si, dans les conditions pratiques de l'exécution du T.I.T., ces anticorps, présents dans le suc testiculaire, pouvaient avoir une action notable sur les tréponèmes constituent la suspension antigénique, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Les testicules d'un lapin présentant une orchite d'évolution prolongée (5 à 7 jours après les premiers signes de son apparition) étaient isolés,

- le 1<sup>er</sup> testicule était soumis à un lavage intensif à l'eau physiologique glacée, puis servait à préparer la suspension antigénique I, pratiquement dépourvue de suc testiculaire,

- le 2<sup>ème</sup> testicule était utilisé directement pour la préparation de la suspension antigénique II qui renfermait donc une certaine quantité de suc testiculaire.

Des sérums connus furent soumis à une double série de T.I.T., la 1<sup>ère</sup> avec la suspension I, la 2<sup>ème</sup> avec la suspension II. Le même lot de complément était distribué dans les 2 séries.

Les pourcentages d'I.S. déterminés dans ces 2 essais ont été rassemblés dans le tableau N° 31 suivant :





TABEAU N° 31 - Pourcentages d'I. S. de tréponèmes sensibilisés déterminés comparativement avec les mêmes sérums, sur une suspension tréponémique riche en suc testiculaire et sur une suspension dépourvue de ce suc :

| PRELEVEMENTS<br>EXAMINES | PROTOCOLE effectué avec des tréponèmes sensibilisés |                                                                    | PROTOCOLE<br>NORMAL |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                          | % d'I. S. déterminés dans la suspension I           | % d'I. S. déterminés dans la suspension II<br>(+ suc testiculaire) | % d'I. S.           |
| Sérum N° 1               | 12 %                                                | 15 %                                                               | 0 %                 |
| Sérum N° 2               | 14 %                                                | 18 %                                                               | 5 %                 |
| Sérum N° 3               | 17 %                                                | 24 %                                                               | 4 %                 |
| Sérum N° 4               | 10 %                                                | 9 %                                                                | 2 %                 |
| Sérum N° 5               | 55 %                                                | 62 %                                                               | 33 %                |
| Sérum N° 6               | 80 %                                                | 80 %                                                               | 58 %                |
| Sérum N° 7               | 92 %                                                | 100 %                                                              | 81 %                |

Les résultats obtenus ne sont pas nettement démonstratif mais une très légère élévation du taux d'immobilisation a été cependant notée dans tous les cas avec la suspension antigénique II riche en suc testiculaire.

Il est possible que les lavages à l'eau physiologique du testicule avant l'extraction des tréponèmes soient insuffisants pour empêcher totalement le passage du suc testiculaire dans la suspension antigénique, ou bien que 2 mécanismes entrent conjointement en jeu : l'un consistant en la fixation d'une partie des anticorps sur des tréponèmes ainsi "sensibilisés", l'autre étant le fait du passage dans la suspension antigénique d'une partie des anticorps restés libres dans le suc testiculaire.

#### 4°) Inhibition de la production d'anticorps du lapin :

Afin d'éviter le phénomène de "sensibilisation" in vivo des tréponèmes certains chercheurs ont tenté de réduire la production précoce d'anticorps chez le lapin en ayant recours à l'utilisation des différents procédés suivants :



a) Irradiation des lapins par les rayons X =

NELSON (95) a pratiqué l'irradiation de lapins par les rayons X avant l'inoculation par *Treponema pallidum*. Les testicules des animaux ainsi traités ne montrent alors plus d'orchite aigue précoce, mais récoltés dans les délais habituels, ils révèlent leur très grande richesse en tréponèmes. Cependant, l'irradiation entraîne la mort de 10 % des lapins en abaissant leur résistance aux autres infections (22).

b) Traitement préventif des lapins susceptibles d'être infectés par *Treponema cuniculi* =

Avant leur utilisation pour la pratique du T. I. T. , les lapins sont traités par la pénicilline pour éliminer éventuellement *Treponema cuniculi* dont les anticorps pourraient être une cause possible de la sensibilisation de *Treponema pallidum* injecté, une période de repos d'un mois précéder ensuite leur inoculation avec la souche tréponémique. Cette pratique ne nous semble pas souhaitable car il existe une différence antigénique entre *T. cuniculi* et *T. pallidum*, malgré la légère réaction croisée existant entre ces deux germes, qui a été notamment observée par KHAN, NELSON et TURNER (64). HAMELIN n'a jamais trouvé un T. I. T. positif en étudiant le sang de lapins inoculés expérimentalement avec *T. cuniculi*, ni avec celui de lapins souffrant de cuniculose naturelle (54). En outre, ce procédé entraîne une complication assez importante des manipulations concernant les animaux.

c) Injections de différentes substances avant l'inoculation et pendant l'évolution de l'infection :

Cortisone : TURNER et HOLLANDER (164) ont préconisé l'administration de cortisone avant l'inoculation du lapin et au cours de son infection tréponémique, cette hormone allongerait le délai d'apparition de l'orchite et freinerait le développement d'anticorps. Il n'est cependant pas certain que les résultats obtenus soient constants. En effet, ROSSETTI et MARSON (142) ont établi que la cortisone ne modifiait pratiquement pas les taux des anticorps immobilisants dans la syphilis humaine où elle est également sans effet sur la production des réagines selon MERKLEN et MIKOL (88).

Enfin, une réactivation des réactions sérologiques a même été enregistrée lors de son emploi, comme de celui de l'A. C. T. H. , par BARUCCI et MORI (3).



- Testostérone : MAGNUSON, ROSENAU et GREENBERG (83) ont indiqué que l'injection de testostérone avant l'inoculation, entraînerait un raccourcissement de l'inoculation de l'orchite syphilitique, et ensuite une évolution plus rapide. L'emploi de cette hormone permettrait donc d'éviter la formation d'anticorps avant l'utilisation des testicules.

- Moutarde azotée (méthyl bis 2 chloro éthylamine) : Cette substance injectée avant l'inoculation retarderait la formation des immobilisines et empêcherait leur apparition pendant le temps nécessaire au développement de l'orchite (22). Mais la marge étroite entre la dose utile et la dose toxique limite son emploi (10 % des animaux succombent à ce traitement).

- P<sub>32</sub> : MIZUMOTO et HAYASHI (92) ont établi que l'injection de P<sub>32</sub> diminuait considérablement la production d'anticorps chez le lapin inoculé expérimentalement par *Treponema pallidum*, comme chez l'homme syphilitique.

La prévention de la sensibilisation des tréponèmes par les différentes techniques signalées semble en définitive peu praticable.

C) Influence de la survie générale des tréponèmes sur la reproductibilité des résultats du T. I. T.

Au cours de nos recherches, nous avons constaté une élévation du pourcentage d'I. S. pour les sérums renfermant des traces d'anticorps, lorsque la survie générale des tréponèmes était diminuée pour une raison inconnue.

Nous indiquons par exemple, dans le tableau suivant N° 32, les résultats enregistrés avec les mêmes sérums, faiblement positifs, au cours d'une série normale et au cours d'une autre ou une mauvaise survie générale des tréponèmes avait été enregistrée :







TABLEAU N° 32 - Influence de la survie générale des tréponèmes sur le % d'I. S.

| PRELEVEMENTS<br>EXAMINES                | PROTOCOLE I<br>(normal) |                        |          | PROTOCOLE II<br>(mauvaise survie<br>générale) |                        |        | ELEVATION<br>du % d'I. S. |
|-----------------------------------------|-------------------------|------------------------|----------|-----------------------------------------------|------------------------|--------|---------------------------|
|                                         | -----                   |                        |          | -----                                         |                        |        |                           |
|                                         | TP/50<br>Té-<br>moin    | TP/50<br>Réac-<br>tion | %d'I. S. | TP/50<br>Té-<br>moin                          | TP/50<br>Réac-<br>tion | %d'IS. |                           |
| Sérum N° 1                              | 48                      | 31                     | 35%      | 40                                            | 8                      | 80%    | 45                        |
| Sérum N° 2                              | 48                      | 28                     | 42%      | 40                                            | 7                      | 82%    | 40                        |
| Sérum N° 3                              | 50                      | 29                     | 42%      | 41                                            | 10                     | 76%    | 34                        |
| Sérum N° 4                              | 49                      | 15                     | 69%      | 42                                            | 4                      | 91%    | 22                        |
| Sérum négatif<br>témoin                 | 48                      | 47                     | 2%       | 40                                            | 40                     | 0%     | 0                         |
| Suspension tré-<br>ponémique seu-<br>le | 48                      |                        |          | 36                                            |                        |        |                           |

TP/50 = nombre de Treponema pallidum mobiles sur 50 dans  
Témoin le tube témoin (complément inactif),

TP/50 = nombre de Treponema pallidum mobiles sur 50 dans  
Réaction le tube à réaction (complément actif).

Les résultats rassemblés dans ce tableau nous montrent que la diminution de la survie générale exalte l'activité immobilisante des anticorps sur les tréponèmes et compromet la reproductibilité des résultats.

Nous pensons que la défaillance partielle des conditions de survie de Treponema pallidum augmente sa sensibilité vis à vis des anticorps immobilisants.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons provoqué artificiellement de mauvaises survies. Les procédés utilisés correspondent à ce qui peut être considéré comme les causes de déficience de la vitalité des tréponèmes pendant l'exécution d'un T. I. T.



1°) Milieu de survie impropre :

Une certaine quantité de milieu de survie a été remplacée par de l'eau physiologique pour préparer la suspension antigénique de tréponèmes. La survie des germes a donc été diminuée par appauvrissement du milieu en éléments nutritifs.

Après 22 heures en anaérobiose, le pourcentage de mobilité des tréponèmes est de 70 à 80 % dans une suspension tréponémique renfermant :

Milieu de survie : 7,5 ml

Eau physiologique : 2,5 ml

2°) Présence d'une substance tréponémicide :

La suspension tréponémique réalisée dans le milieu de survie pur était additionnée de traces de pénicilline de manière à provoquer l'immobilisation "toxique" d'une partie des tréponèmes : après 22 heures en anaérobiose le pourcentage de mobilité des tréponèmes est de 70 à 80 % pour une suspension renfermant =

0,5 gamma de Pénicilline G sodique Spécia par 10 ml.

3°) Modification de l'une des constantes biologiques de *Treponema pallidum* (élévation de la température) :

Le pourcentage de mobilité des tréponèmes est de 70 à 80 % après 22 heures en anaérobiose à une température de 37°C ( nous rappelons que la survie totale est obtenue à 35°C, température qui par ailleurs règne à l'intérieur des testicules).

Nous indiquons dans le tableau suivant N° 33 les pourcentages d'I. S. déterminés dans de telles conditions de mauvaise survie provoquée avec les mêmes sérums ou dilutions d'un "pool".



TABLEAU N° 33 - Elevation du % d'I. S. en fonction de la diminution de la survie générale, provoquée expérimentalement :

| PRELEVEMENTS<br>EXAMINES      | PROTOCOLE<br>NORMAL |    |      | Suspension<br>+ eau phys. |    |      | Suspension<br>+ pénicill. |    |      | T° = 37°C |    |      |
|-------------------------------|---------------------|----|------|---------------------------|----|------|---------------------------|----|------|-----------|----|------|
|                               | TP/50               |    | %IS. | TP/50                     |    | %IS. | TP/50                     |    | %IS. | TP/50     |    | %IS. |
|                               | T.                  | R. |      | T.                        | R. |      | T.                        | R. |      | T.        | R. |      |
| Sérum négatif<br>témoin       | 48                  | 46 | 4%   | 41                        | 40 | 2%   | 39                        | 32 | 18%  | 38        | 40 | 0%   |
| Sérum positif<br>(pool) dilué |                     |    |      |                           |    |      |                           |    |      |           |    |      |
| 1/16                          | 48                  | 0  | 100% | 40                        | 0  | 100% | 41                        | 0  | 100% | 39        | 0  | 100  |
| 1/32                          |                     | 11 | 77%  |                           | 0  | 100% |                           | 0  | 100% |           | 3  | 95%  |
| 1/64                          |                     | 29 | 40%  |                           | 7  | 82%  |                           | 3  | 93%  |           | 6  | 85%  |
| 1/128                         |                     | 38 | 21%  |                           | 21 | 48%  |                           | 8  | 80%  |           | 15 | 62%  |
| 1/256                         |                     | 44 | 8%   |                           | 32 | 20%  |                           | 31 | 24%  |           | 32 | 18%  |
| Sérum douteux                 | 50                  | 26 | 48%  | 39                        | 38 | 79%  | 38                        | 4  | 89%  | 40        | 7  | 82%  |
| Sérum douteux                 | 49                  | 32 | 31%  | 40                        | 8  | 80%  | 39                        | 11 | 72%  | 39        | 6  | 85%  |

TP/50 T. = Nombre de Treponema pallidum mobiles sur 50 dans le tube témoin (T.), à complément inactivé,

TP/50 R. = Nombre de Treponema pallidum mobiles sur 50 dans le tube à réaction (R.) à complément actif.

L'examen des résultats portés dans ce tableau montre une élévation importante du pourcentage d'I. S. dans tous les essais où la survie générale a été diminuée. Les tréponèmes semblent donc plus sensibles à l'action des immobilisines lorsque les conditions de survie, pour différentes causes, sont défavorables.

Cette élévation du pourcentage d'I. S. n'est observée que pour les sérums faiblement positifs qui renferment des traces d'anticorps. Par contre, les sérums négatifs, dépourvus d'anticorps, déterminent le même pourcentage d'I. S. puisque la survie est abaissée de la même manière dans le tube témoin et dans le tube à réaction avec de tels sérums.

Une seule exception à cette règle doit cependant être signa-





lée : nous avons remarqué que, dans les suspensions additionnées de traces de pénicilline, l'immobilisation des tréponèmes par l'antibiotique était plus intense en présence de complément actif qu'en présence de complément inactif.

Les résultats ainsi obtenus au cours de l'un de ces essais, sont rassemblés dans le tableau suivant N° 34.

TABLEAU N° 34 - Augmentation du pouvoir immobilisant de la pénicilline sur *Treponema pallidum* en présence de complément :

| NUMERO DES TUBES |                                                                                     | Nombre de Tréponèmes mobiles / 50  |                                  |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
|                  |                                                                                     | Tube avec compl. inactivé (0,15ml) | Tube avec compl. actif (0,15 ml) |
| 1                | Suspension tréponémique (0,5 gamma Péné/10 ml) 0,35 ml                              | 38                                 | 30                               |
| 2                | Suspension tréponémique ident. 0,35 ml<br>+ ultra-filtrat de sérum de boeuf 0,05 ml | 40                                 | 32                               |
| 3                | -id- + sérum négatif 0,05 ml                                                        | 39                                 | 35                               |
| 4                | -id- + sérum négatif 0,05 ml                                                        | 40                                 | 29                               |
| 5                | -id- + sérum négatif 0,05 ml                                                        | 38                                 | 33                               |
| 6                | -id- + sérum négatif 0,05 ml                                                        | 39                                 | 36                               |
| 7                | -id- + sérum négatif 0,05 ml                                                        | 40                                 | 31                               |

Il semble donc que le pouvoir tréponémicide de la pénicilline soit légèrement exalté en présence d'alexine.

C'est pourquoi, il ne nous paraît pas souhaitable d'ajouter de la pénicillinase à la composition du milieu de survie pour éliminer directement au cours du temps de réaction, d'éventuelles traces de pénicilline dans les sérums des malades en cours de traitement, comme le préconisent certains auteurs (44). Il peut toujours, dans ces conditions, subsister des traces infimes de l'antibiotique qui pourront élever le pourcentage d'immobilisation des tréponèmes en présence de complément actif et compromettre la reproductibilité des résultats.





Nous préférons constater dans un 1<sup>er</sup> test, le pouvoir tréponémicide partiel ou total du sérum, et exécuter un 2<sup>ème</sup> test après élimination préalable de l'antibiotique au moyen d'un excès de pénicillinase.

Enfin, nous signalerons qu'une amélioration de la reproductibilité peut être obtenue en pratiquant 2 T. I. T. pour chaque échantillon de sérum.

### III) Amélioration de la sensibilité du T. I. T. :

La sensibilité du T. I. T. peut être considérée comme très satisfaisante du point de vue de son utilisation clinique, elle permet de déceler encore des traces d'immobilisines dans les cas de syphilis anciennes ou traitées. Cependant, il est intéressant du point de vue expérimental, d'améliorer cette sensibilité afin de pouvoir détecter des quantités infimes d'anticorps dans l'étude immunologique des tréponématoses.

Différents procédés ont été proposés.

#### 1°) Allongement du temps de réaction :

ROSENAU et KENT (140) en prolongeant le temps de contact de l'antigène et des anticorps à 40 heures ont constaté une sensibilité beaucoup plus grande de la réaction pour mettre en évidence les traces d'immobilisines :

la même dilution d'un sérum positif donne ainsi =  
47 % d'I. S. après 18 heures,  
93 % d'I. S. après 40 heures.

PORTELLA par ailleurs (119) (120) a déterminé que l'immobilisation spécifique était proportionnelle au carré du temps de réaction.

La détérioration éventuelle du complément au cours d'un temps aussi prolongé est compensée par l'addition d'une dose supplémentaire d'alexine de l'ordre de 0,05 ml par tube après 18 heures.

L'intérêt de cette technique est la mise en évidence des immobilisines dans le sérum de malades atteints de syphilis primaire, stade où leur apparition n'est généralement pas décelable par le T. I. T. classique.

Il nous semble cependant que la durée du temps de maintien in vitro des tréponèmes augmente considérablement les risques de



leur mauvaise survie et par la même occasion augmente le pouvoir tréponémicide de certains sérums.

2°) Diminution de la densité tréponémique de la suspension antigénique :

NELSON (98) avait indiqué que la sensibilité du T.I. T. demeurait identique lorsque la densité tréponémique de la suspension antigénique variait entre 5 et 15 tréponèmes par champ microscopique.

MILLER, BOAK et CARPENTER (89) ont essayé des concentrations en tréponèmes plus faibles. La sensibilité se révéla alors augmentée : ainsi le pourcentage d'I. S. déterminé par un sérum faiblement positif s'élève de 56 % (suspension à 5 tréponèmes par champ) à 92 % (suspension à 1 tréponème par champ).

Nous avons essayé cette technique dont la lecture s'est avérée longue et difficile, en outre, les risques de déficience de la survie se sont trouvés augmentés.

Le pourcentage de mobilité des tréponèmes, après 22 heures de séjour en anaérobiose, a toujours été trouvé entre 80 et 90 % dans les tubes témoins, alors qu'il s'élevait à 100 % dans les suspensions à 10 tréponèmes par champ préparées avec les mêmes orchites.

3°) Augmentation de la dose de sérum expertisé :

BONCINELLI, VACCARI et PINCELLI (13), afin de mieux interpréter tout résultat douteux éventuel du T.I. T., ont pratiqué simultanément un test normal sur 0,05 ml de sérum et un autre avec une quantité double de sérum (0,10 ml), sans aucune modification des autres réactifs. Une amélioration notable de la sensibilité serait ainsi obtenue : le pourcentage moyen d'I. S. d'un lot de sérums douteux passa de 32,2% à 70,6 %.

Nous avons utilisé ce procédé qui s'est montré très efficace. Il nous paraît plus sûr et plus simple que la technique de MILLER précédemment décrite. Il nous a permis notamment de mettre en évidence des traces d'immobilisines chez des sujets dont le T.I. T. normal était négatif ou douteux :

Un tel résultat a été observé en particulier dans ces cas suivants :



1) Chez 2 sujets atteints de syphilis primaire,

2) Chez 2 sujets ayant présenté une syphilis secondaire et traitée, et dont le T. I. T. s'était assez rapidement négativé,

3) Chez 1 enfant de 12 mois, issu de mère syphilitique traitée, non contaminée, et dont le T. I. T. s'était négativé à l'âge de 8 mois (SAULAPPE (148) a signalé que les nourrissons nés de mère syphilitique et non infectés conservent, dans les 6 mois suivant leur naissance, un T. I. T. positif dû au passage des anticorps maternels dans le fœtus),

4) Chez divers sujets susceptibles d'avoir eu un "passé syphilitique", c'est-à-dire d'avoir souffert d'une syphilis ayant évolué spontanément ou sous l'effet d'une thérapeutique non signalée :

|               | % d'I. S.<br>(dose normale de<br>sérum : 0,05 ml) | % d'I. S.<br>(dose doublée de<br>sérum : 0,10 ml) |
|---------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1 légionnaire | 12 %                                              | 37 %                                              |
| 1 prostituée  | 17 %                                              | 45 %                                              |
| 1 prostituée  | 23 %                                              | 49 %                                              |
| 1 "colonial"  | 20 %                                              | 40 %                                              |

Par contre, certains sérums qui, testés à la dose habituelle, provoquent une très légère immobilisation spécifique, ne montrent pas une élévation du pourcentage d'I. S. avec la dose doublée, d'autres encore permettent d'obtenir également une faible immobilisation des tréponèmes du tube témoin (complément inactif) et, de ce fait, d'attribuer le résultat douteux à la présence de traces infimes tréponémicides.

Dans les cas douteux, la technique de BONCINELLI s'avère donc d'une utilité incontestable.

#### 4°) Action du Calcium :

CHORPENNING et BEERS (19) ont recherché si l'effet sensibilisant du Calcium sur l'hémolyse des hématies par le sérum hémolytique en présence de complément était retrouvée dans le T. I. T. Des ions  $\text{Ca}^{++}$  ont été introduits dans le milieu de survie sous forme de  $\text{CaCl}_2$ ,  $20\text{H}_2$  à raison de 20 mg pour 10 ml. Dans ces conditions, les valeurs des I. S. se sont élevées assez considérablement sans que soit modifiée la survie générale des tréponèmes. Cet effet est accompagné d'une hémolyse accrue dans le titrage du complément résiduel après la





lecture du test.

Il semble donc que l'action du calcium dans le T.I. T. soit sans rapport avec la sensibilité des tréponèmes vis à vis des anticorps, mais soit lié à l'influence de cet ion sur l'alexine. Le calcium possède en effet un pouvoir protecteur vis à vis du complément dont il active également l'intervention dans la réaction antigène-anticorps (71).

5°) Action de la cocarboxylase :

BOREL (15) a montré que les substances modifiant le métabolisme du tréponème interviennent dans son immobilisation par les immobilisines.

C'est ainsi que les composés ralentissant le métabolisme de *Treponema pallidum*, comme la chlorpromazine, augmentent sa résistance face à l'agression des anticorps immobilisants, le pourcentage d'I. S. se trouve ainsi abaissé.

Par contre, les composés accélérant le métabolisme du spirochète, comme la cocarboxylase, augmentent sa sensibilité vis à vis des anticorps. L'adjonction de cet enzyme permet de voir s'élever notablement le pourcentage d'I. S. en présence de traces d'anticorps. La survie générale des tréponèmes n'est pas modifiée et l'action du complément reste inchangée car l'hémolyse résiduelle demeure égale.

Nous voyons donc que différents procédés permettent d'améliorer la sensibilité du T.I. T.. Leur intérêt du point de vue clinique est très faible et reste essentiellement théorique. La technique de BONCINELLI (13) paraît actuellement la plus simple à pratiquer, elle permet d'élucider quelques cas douteux en décelant des traces d'anticorps.



CHAPITRE VI  
=====

ETUDE COMPAREE DU T. I. T. ET DES REACTIONS  
=====

UTILISANT LES ANTIGENES CARDIOLIPIDIQUES  
=====



ainsi que FLORES-CEVALLOS (42) a étudié la distribution des tréponématoses suivant les différentes zones climatiques du PEROU.

Il a constaté qu'une première tréponématose, le "Mal del Pinto" ou caraté se propage uniquement sur la côte aride péruvienne et dans les vallées interandines à climat sec. Une deuxième tréponématose, le Pian, n'est jamais observée dans cette zone, mais se rencontre dans la région des forêts à climat chaud et pluvieux et à végétation exubérante où le Mal Del Pinto n'est jamais observé.

Pour toutes ces raisons, le T. I. T. pourrait être ainsi considéré comme pratiquement spécifique d'un seul germe, "agent causal des tréponématoses".

Nos travaux personnels concernant le T. I. T. n'ont pu envisager que le diagnostic de la syphilis, ils nous ont permis toutefois de constater la spécificité de cette réaction dont les résultats n'ont jamais été mis en cause.

En particulier les tests pratiqués sur des sangs de malades atteints de spirochétose à BORRELIA et à LEPTOSPIRA furent tous négatifs, à l'exception d'un. Il s'agissait du sérum d'un sujet atteint d'une angine de VINCENT chronique et qui renfermait des traces d'immobilisines dont nous pûmes constater l'existence à plusieurs reprises. L'hypothèse d'une syphilis ancienne ne put toutefois être rejetée.

## II) Réagines et immobilisines :

### 1° ) Nature différente des réagines et des immobilisines :

La différenciation entre les immobilisines, mises en évidence par le T. I. T., et les réagines détectées par les réactions d'hémolyse et de floculation à base d'antigènes lipidiques utilisés dans la sérologie dite "classique" a été établie par NELSON et MAYER (98) qui ont montré que l'absorption des réagines du sérum des syphilitiques par un antigène lipidique laisse inchangé son activité immobilisante sur le tréponème. VAISMAN et HAMELIN (167) ont séparé les immobilisines des réagines par ultra-centrifugation à 80.000 t/m poursuivie durant 6 à 48 heures, en isolant ainsi la totalité des réagines dans le culot de centrifugation.

VINCENT, BASEX et SALVATOR (168) en utilisant la méthode électrophorétique bidimensionnelle ont récemment montré que les réagines sont localisées entre les bêta-globulines et les gamma-globuli-





nes, alors que les immobilisines migrent avec les gamma-globulines. OTTO-LENGHI-LODIGLIANI et SPAGNOLI (113) ont également conclu à une situation extra-gamma-globulinique des réagines, en pratiquant la séparation fluxophorétique des sérums syphilitiques. Avant ces travaux, les réagines étaient considérées comme superposées aux gamma-globulines.

De nombreuses autres caractéristiques différencient les réagines et les immobilisines, telles que la thermo-stabilité plus faible des réagines ou l'origine antigénique (on sait que la production des réagines est déclenchée par une fraction lipidique du tréponème et celle des immobilisines par une fraction protéique).

## 2°) Evolution des anticorps au cours de la syphilis :

Au cours de l'infection tréponémique, les réactions classiques se positivent les premières, généralement 20 à 30 jours après l'apparition de l'accident primaire. Le T.I.T. devient positif plus tardivement, en moyenne 40 à 60 jours après l'accident primaire. Son virage est considéré comme se produisant au début de la période secondaire. Nous avons signalé, lors de l'étude du développement des anticorps chez le lapin syphilité, cette précocité des réagines par rapport aux immobilisines dans le sang des animaux inoculés pour la pratique du test. Pendant toute la période évolutive de la maladie, le T.I.T. et les réactions classiques se maintiennent positifs. Dans les syphilis traitées et anciennes, la négativation de la sérologie classique précède celle du T.I.T., celui-ci reste positif pendant un laps de temps variable d'un sujet à l'autre et selon l'intensité du traitement entrepris. Cette positivité peut même persister toute la vie malgré la disparition de l'infection.

Les résultats de la sérologie classique et du T.I.T. peuvent donc présenter une concordance ou une discordance. Nous indiquons ci-dessous les interprétations cliniques des différentes éventualités en fonction de la présence ou de l'absence des réagines et des immobilisines dans le sang.

### 1°) T.I.T. négatif (0 à 20 % d'I.S.) et :

- 1) Sérologie classique négative =
  - pas d'infection tréponémique
  - syphilis primaire (1° phase)
  - syphilis ancienne traitée

- 2) Sérologie classique partiellement positive =





- syphilis primaire (début de la 2° phase)
- réaction "faussement positive" chez les sujets non atteints de tréponématose mais dont le sérum renferme des réagines pour des causes très diverses (B. F. P. R. = Biologic False Positive Reactor de la littérature anglo-saxonne)

3) Sérologie classique positive =

- syphilis primaire (2° phase)
- réaction "faussement positive" (cas très rare)

II°) T. I. T. partiellement positif (21 à 80 % d'I. S. ) et :

1) Sérologie classique négative =

- syphilis ancienne traitée

2) Sérologie classique partiellement positive =

- cette éventualité ne peut pas être rencontrée en principe

3) Sérologie classique positive =

- syphilis secondaire (début)

III°) T. I. T. positif (81 à 100 % d'I. S. ) et :

1) Sérologie classique négative =

- syphilis ancienne traitée en fin d'évolution

2) Sérologie classique partiellement positive =

- syphilis secondaire ou tertiaire sous traitement en voie d'amélioration

3) Sérologie classique positive =

- syphilis évolutive, secondaire ou tertiaire

Ces différentes éventualités d'interprétation ont été résumées dans le tableau suivant N° 35.



- réactions dont certaines sont positives
- réactions toutes positives

TABLEAU N° 36 - Répartition des résultats de l'examen de 4 103 sérums sanguins par le T.I. T. et la sérologie classique :

|                                                  | Nombre total de sérums | Séro. class. négative | Sér. class. partiellement positive | Sér. class. positive |
|--------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|
| T. I. T. négatif<br>(0 à 20 % d'I. S. )          | 2521                   | 2459                  | 39                                 | 23                   |
| T. I. T. douteux<br>(21 à 50 % d'I. S. )         | 183                    | 163                   | 10                                 | 10                   |
| T. I. T. faiblement positif (51 à 80 % d'I. S. ) | 128                    | 105                   | 15                                 | 8                    |
| T. I. T. positif<br>(81 à 100 % d'I. S. )        | 1106                   | 574                   | 150                                | 382                  |

On a noté 165 sérums non interprétables par le T. I. T.  
(toxiques pour le tréponème)

Nous constatons que 4,1 % des sérums se sont révélés toxiques pour le tréponème en l'absence de complément et n'ont pu fournir d'indication par le T. I. T.

95,9 % des sérums ont fourni un résultat, Parmi les prélèvements qui ont pu être soumis au T. I. T. :

35,9 % ont révélé la présence d'immobilisines.

(Dans 28,0 % il s'agissait de quantités importantes d'anticorps).

15,9 % renfermaient des réagines.

L'écart de ces deux chiffres souligne la sensibilité nette-



ment supérieure du T. I. T. par rapport aux réactions classiques dans le diagnostic de la syphilis. Le T. I. T. s'est donc montré deux fois plus sensible.

Nous avons entrepris l'analyse des différentes catégories de résultats en retenant dans chacune les observations particulièrement intéressantes et originales.

A ) T. I. T. négatifs :

Nous donnerons d'abord les résultats de l'étude du groupe des sérums ayant présenté un T. I. T. négatif et des réactions classiques également négatives.

L'immense majorité des sérums de ce groupe a déterminé un pourcentage d'I. S. voisin de zéro. Ils sont donc considérés comme dépourvus d'anticorps immobilisants. L'immobilisation de 1 à 2 tréponèmes sur 100, en présence de complément actif, ne peut être interprétée comme spécifique.

Quelques sérums cependant ont provoqué un pourcentage d'I. S. compris entre 10 et 20 % d'I. S.

Nous avons ainsi noté =

- 2 201 sérums donnant un pourcentage d'I. S. de 0 à 10 %; soit 93,4 % des sérums de ce groupe,
- 160 sérums donnant un pourcentage d'I. S. de 11 à 20 % soit 6,3 %.

On peut se demander si l'immobilisation spécifique très faible mais décelable, provoquée par ces sérums interprétés comme négatifs selon le critère de NELSON, correspond à des traces d'anticorps en rapport avec une tréponématose.

Nous avons signalé que la présence de telles traces d'immobilisines peut être confirmée par la technique de BONCINELLI (13) qui accroît la sensibilité de la réaction. Il s'agirait dans ces cas, de syphilis évoluées et terminées, souvent anciennes, en effet nous avons mis en évidence des quantités infimes d'anticorps immobilisants dans le sang de sujets susceptibles d'avoir un "passé syphilitique".

Ces traces d'anticorps peuvent aussi persister après une





courte syphilis stopée à son début par une thérapeutique intense. Pour illustrer cette dernière possibilité, nous indiquons l'observation suivante :

OBSERVATION N° 1 :

- 23.6.1959 : Le sujet (31 ans) présente une syphilis secondaire se traduisant par une roséole. La Sérologie classique est fortement positive, le T.I.T. donne 30 % d'I.S. Un traitement intense est prescrit.
- 23.7.1959 : La sérologie classique est devenue négative, le T.I.T. est à 68 % d'I.S.
- 1.9.1959 : La sérologie classique reste négative. Le T.I.T. est à 13 % d'I.S. et par la technique de BONCINELLI, il s'élève à 38 % d'I.S.
- 20.4.1960 : La sérologie classique est négative. Le T.I.T. est à 15 % et par la technique de BONCINELLI, il s'élève à 36 % d'I.S.

Remarques : 1) Le très faible pourcentage d'I.S. observé 2 à 8 mois après la négativation de la sérologie classique correspond à des traces d'anticorps.

2) Le retard d'apparition des immobilisines, par rapport aux réagines, est significatif : le malade n'a pas eu pratiquement le temps de fabriquer des anticorps immobilisants en quantité importante avant l'élimination des réagines, et, cependant, le pourcentage d'I.S. continue à s'élever, après cette élimination, et atteint 68 %.

Cependant les sérums déterminant une I.S. comprise entre 10 et 20 % et dépourvus de réagines, ne proviennent pas tous de sujets anciennement syphilitiques.

L'observation suivante montre un tel fait :

OBSERVATION N° 2 :

Un sujet de 23 ans et sans antécédent syphilitiques a été examiné pendant une période de 3 ans. La sérologie classique s'est toujours montrée négative alors que le T.I.T. révélait un faible pourcentage d'I.S. qui s'est maintenu durant toute la durée de cette période, comme on peut le voir dans le tableau suivant :



| Date des prélèvements : | Résultats du T. I. T.<br>% d'I. S. |
|-------------------------|------------------------------------|
| 8. 11. 1958             | 12 %                               |
| 27. 1. 1959             | 14 %                               |
| 1. 7. 1959              | 11 %                               |
| 16. 10. 1959            | 15 %                               |
| 22. 12. 1959            | 14 %                               |
| 9. 3. 1960              | 16 %                               |
| 4. 8. 1960              | 13 %                               |
| 16. 11. 1960            | 15 %                               |
| 25. 4. 1961             | 12 %                               |

En pratiquant, dans ce cas, la technique de BONCINELLI, le pourcentage d'I. S. s'est élevé à une valeur maxima de 26 %.

L'observation d'un faible pourcentage d'I. S. est donc constante dans le sang de ce sujet. Elle est difficilement explicable, mais la présence de traces infimes d'immobilisines naturelles peut toutefois être invoquée.

L'étude du groupe des sérums ayant présenté un T. I. T. négatif et des réactions classiques positives est également très intéressantes.

Les 62 sérums appartenant à cette catégorie peuvent provenir d'un sujet atteint d'une syphilis récente ou d'un B. F. P. R. (Biologic false positive reactor). Les auteurs anglo-saxons ont vulgarisé cette dénomination qui groupe les sujets non atteints de tréponématose et dans le sang renferme des réagines. La réaction est alors biologique et "faussement positive".

L'origine de ces réagines est attribuée à de multiples causes. Elles sont considérées comme accompagnant principalement les maladies infectieuses et les états fébriles (82), et les collagénoses (38) (76).

La lèpre (57) (118), le paludisme, la pneumonie atypique, les fièvres récurrentes et le lupus érythémateux (145) sont le plus fréquemment cités, comme responsables de telles réactions. Nous rappellerons également que la grossesse peut provoquer des réactions faussement positives (66), ainsi que le cancer cervical dont la résection opératoire négativerait les réactions positive de la patiente." La sous-alimentation est aussi invoquée comme facteur de fausses positivités, ce qui expliquerait le pourcentage élevé de B. F. P. R. dans les populations sous-

(") Réf. 147.



développées (171).

Les donneurs de sang peuvent être également classés comme d'éventuels B. F. P. R. (39). Enfin, une transmission passive des réagines non syphilitiques de la mère B. F. P. R. à l'enfant a été observée dans 18 % des cas par MILLER et ses collaborateurs (90).

Dans nos essais, les causes le plus souvent rencontrées sont, dans l'ordre d'importance, paludisme, pneumonie atypique, cirrhose, tuberculose, grossesse.

Le mécanisme de la production de telles réagines non syphilitiques est encore mal connu. Selon NICOLAU et ses collaborateurs (100), l'apparition des réactions d'hémolyse faussement positives coïnciderait avec l'augmentation du taux des lipides sériques, l'apparition des réactions de floculation faussement positives suivrait l'élévation de la teneur du sérum en gamma-globulines. Cependant ROLLIER et PLANCHER (139) ont démontré que dans la lèpre, il existait un parallélisme entre les fausses réactions syphilitiques et la densité bacillaire, il n'en serait pas de même de l'augmentation des gamma-globulines sériques qui, dans cette affection, est sans rapport avec la présence de réagines non syphilitiques.

D'autre part, la fréquence des fausses réactions dans les cas de troubles entraînant la circulation d'anticoagulants dans le sang, notamment les collagéoses, a amené LAURELL et NILLSON (72) à rechercher si les réagines et les antithromboplastines ne seraient pas identiques. Ces deux substances ont une même mobilité électrophorétique, mais peuvent être partiellement séparées par absorption de la réagine par un antigène car diolipique. Ces auteurs considèrent que les réagines non spécifiques et les anticoagulants, substances communes ou non, causes de ces perturbations pathologiques, peuvent être interprétées comme des anticorps résultant d'un processus d'auto-immunisation.

Enfin, PETRUCCIO (116) a expliqué l'apparition des fausses réactions positives observées chez les donneurs de sang, comme le résultat d'un stimulus consécutif au prélèvement de sang, ce stimulus provoquerait un passage dans le plasma, de globulines spéciales, identiques aux réagines syphilitiques, en provenance du tissu réticulaire, et en particulier du tissu médullaire.

Dans certains cas, la présence de réagines non spécifiques ne peut être rattachée à une cause pathologique ou physiologique, l'observation suivante illustre cette éventualité :





OBSERVATION N° 3 :

Madame B. . . avait présenté en juillet 1952, au cours d'un examen pré-nuptial, des réactions classiques totalement positives avec absence de signes cliniques et d'antécédents syphilitiques. Un traitement antisypilitique fut cependant institué, mais les réactions conservèrent leur positivité.

En février 1959, le sang de cette patiente nous est adressé pour examen. Le T. I. T. pratiqué s'est alors révélé négatif (2 % d'I. S.) bien que les réactions de floculations fussent toujours positives et les réactions d'hémolyse discordantes (DEMANCHE : positif et KOLMER : négatif).

En novembre 1960, un nouvel examen donne un T. I. T. négatif (0 % d'I. S.) alors que les réactions classiques sont toutes positives.

Le sang ne montrait par ailleurs aucune perturbation biochimique notable. Le T. I. T. et les réactions classiques pratiquées sur le sang du mari et sur celui de l'enfant né de leur union, étaient négatifs.

On se trouve donc vraisemblablement en présence d'un cas de B. F. P. R. chronique et de cause non définie. Une telle persistance de réagines avec T. I. T. négatifs a été observée également par BASSET, DAGUET et MONFORT (4). Nous pensons cependant que la présence de ces réagines peut être aussi expliquées grâce à l'hypothèse suivante, elles auraient été développées au cours d'une syphilis primaire ayant échappé à l'examen clinique et stopée par le traitement qui a été institué, avant l'apparition moins précoce des immobilisines, l'organisme aurait alors continué à maintenir ce taux de réagines dans le sang par "mémoire humorale", malgré la fin de l'infection tréponémique qu'il aurait subie.

B) T. I. T. positifs :

La présence d'immobilisines a été détectée dans les 1 317 sérums qui ont déterminé un pourcentage d'I. S. compris entre 21 et 100 %.

Nous avons classé les résultats obtenus suivant un critère d'interprétation légèrement différent de celui indiqué par NELSON (98). Ce critère a été adopté à la suite de l'étude de la correspondance





clinique d'un grand nombre de résultats de T. I. T. Il peut se résumer ainsi :

- Une I. S. de 21 à 50 % révèle la présence de traces infimes d'immobilisines dont la signification est considérée comme "douteuse".

- Une I. S. de 51 à 80 % indique la présence d'une faible quantité d'anticorps immobilisants dans le sang et le résultat est interprété comme "faiblement positif".

- Une I. S. de 81 à 100 % correspond à une grande quantité d'anticorps immobilisants et le résultat est considéré comme "positif".

1) Sérums riches en anticorps immobilisants : (I. S. de 80 à 100 %)

On ne peut concéder une véritable richesse en anticorps qu'aux seuls sérums ayant provoqué une I. S. de 100 %. Ce pourcentage correspond cependant à des taux en anticorps très variables, les uns moyennement élevés, les autres plus élevés, l'immobilisation des tréponèmes étant totale dans l'un et l'autre cas puisque leur concentration en anticorps est égale ou supérieure à la concentration minima nécessaire à l'immobilisation de 100 % des tréponèmes. Les sérums envisagés sont susceptibles, pour la plupart d'entre eux, de fournir un titre élevé à l'épreuve du test quantitatif qui consiste en la recherche de la dilution sérique provoquant une I. S. de 50 % : ce titrage est réalisé en diluant progressivement le sérum et en testant les dilutions obtenues, le titre est exprimé par l'inverse de la dilution capable d'immobiliser 50 % des tréponèmes, par exemple, un sérum dilué au 1/20, soumis au T. I. T., donne 50 % d'I. S., dans le tube de réaction, il s'est trouvé encore 10 fois plus dilué :

|                     |         |
|---------------------|---------|
| - Dilution sérique  | 0,05 ml |
| - Complément        | 0,15 ml |
| - Suspension trépo. | 0,35 ml |

Sa dilution finale sera donc de 1/200 et son titre quantitatif correspond à 200.

Le titre des sérums ayant donné 100 % d'I. S. dans la réaction qualitative ordinaire, peut varier entre 50 et 3 000. Nous n'avons pu pratiquer de tests quantitatifs sur tous les sérums de cette catégorie, mais nous avons pu constater sur un petit lot que la plupart d'entre eux (90 % environ) présente un titre élevé. Il peut donc exister une différence essentielle théorique entre un sérum déterminant 100 % d'I. S. et un sérum déterminant 99 % d'I. S., lors d'un test normal.



Cependant, lors de la lecture d'un test d'immobilisation qualitatif ordinaire exécuté sur un sérum riche en immobilisines, et correspondant à un titre quantitatif élevé, nous avons pu remarquer, comme FRIBOURG-BLANC (43), à côté de tous les tréponèmes immobilisés, la survie de quelques très rares tréponèmes demeurés mobiles qui pourraient correspondre à des formes de résistance. Dans de telles conditions, un résultat d'I. S. de 99 % peut être considéré comme identique à 100 %. Seule, l'épreuve quantitative permettra de différencier éventuellement les interprétations de ces pourcentages d'I. S.

Aussi pour plus de sécurité, nous avons groupé les sérums déterminant un pourcentage d'I. S. compris entre 80 et 100 % et nous avons constaté que :

- 81,1 % de ceux-ci présentaient un pourcentage d'I. S. de 100 %,
- 7,3 % un pourcentage d'I. S. de 95 à 99 %,
- 1,4 % un pourcentage d'I. S. de 80 à 89 %.

On voit donc que la grande majorité de ces sérums renferme des quantités importantes d'anticorps immobilisants et qu'ils doivent être considérés comme "positif".

Ces sérums positifs provenaient de malades présentant

- une syphilis secondaire non encore traitée,
- une syphilis symptomatique tardive,
- ou une syphilis latente asymptomatique.

Dans les cas de syphilis secondaire, le T. I. T. est généralement positif et accompagné d'une sérologie classique positive; dans les cas de syphilis symptomatiques tardives, il en est de même, les sérums examinés dans ces essais provenaient de sujets présentant les syndromes les plus variés : tabès, gomme, mal perforant, aortite, paralysie générale, uvéite etc. . . , ils renfermaient dans leur grande majorité des réagines, excepté pour quelques prélèvements effectués chez des malades ayant bénéficié d'un traitement très prolongé.

Si, dans ces deux premières catégories, la présence des immobilisines apparaît liée à un processus infectieux, elle est plus difficilement explicable dans le sérum des sujets atteints de syphilis latente asymptomatique.



Il peut s'agir d'anciens syphilitiques qui furent traités efficacement et ne présentent plus de signes cliniques de leur ancienne affection, ou bien d'individus dépourvus d'antécédents syphilitiques et qui ne montrent pas de lésions décelables, malgré la présence d'anticorps immobilisants tréponémiques dans leur sang; Le terme de "syphilis sérologique" a été utilisé pour dénommer de tels cas (128) (156), considérés comme de plus en plus fréquents par de nombreux laboratoires.

Différentes hypothèses peuvent justifier la découverte d'immobilisines dans le sang de ces sujets, elles invoquent la conservation de la faculté de fabrication des anticorps dans l'organisme malgré la disparition de l'antigène, ou bien la libération progressive et lente du stock accumulé lors de l'agression tréponémique, ou encore l'existence de foyers de tréponèmes ayant acquis des formes de résistance et dépourvus d'activité pathogénique apparente.

La négativation du T. I. T. qui peut être obtenue chez ces patients par un traitement par la tétracycline selon SCARPA et IPPOLITO (150) serait alors en faveur d'une présence de tréponèmes résistants dans l'organisme de ces sujets.

On peut considérer également que les thérapeutiques à base d'antibiotiques utilisés pour combattre de nombreuses affections, même bénignes, contribuent à "décapiter" des syphilis récentes qui ne sont découvertes que beaucoup plus tard, à l'occasion d'une exploration sérologique. Elles présentent alors un caractère latent et asymptomatique.

La sérologie classique, considérée comme généralement négative dans les cas de syphilis définitivement traitées et de syphilis occultés, peut par son manque de spécificité rendre difficile l'explication de certains bilans sérologiques, comme le témoigne l'observation suivante :

#### OBSERVATION N° 4 :

Le patient est un ancien syphilitique dont les réactions classiques se sont négativées en 1954 à la suite d'un traitement prolongé, mais dont le T. I. T. restait fixé à 100 % d'I. S.

En mai 1960, le T. I. T. se révélait toujours positif à 100 % d'I. S. mais les réactions classiques étaient à nouveau positives.

En juillet 1960, les réactions classiques étaient redeve-







nues négatives et le T. I. T. était demeuré positif à 100 % d'I. S.

Dans la période précédant le prélèvement effectué en mai 1960, le sujet avait présenté une crise de zona qui vraisemblablement était à l'origine de la positivité des réactions classiques. Il semble donc qu'on puisse observer, chez le même individu, la présence simultanée de réactions classiques faussement positives et d'un T. I. T. positif.

Enfin, le passage des immobilisines de la mère non contagieuse ancienne syphilitique traitée à son enfant, évoque la possibilité d'une richesse en immobilisines d'un sang sans rapport avec une infection tréponémique : chez le nourrisson, issu de mère syphilitique traitée, le T. I. T. se négative en moyenne 6 mois après la naissance sans qu'aucun traitement ne soit institué (9) (148).

## 2) Sérums pauvres en anticorps immobilisants :

Les sérums renfermant des traces d'immobilisines ne peuvent être en principe que dépourvus de réagines (syphilis ancienne en fin d'évolution immunologique), ou, au contraire, en contenir une quantité importante dans le cas de syphilis récente, primaire ou secondaire, où l'apparition massive des réagines précède celle des immobilisines plus progressive.

Cependant, nous avons constaté la présence simultanée de traces d'immobilisines et de faibles quantités de réagines (réactions classiques partiellement et faiblement positives) chez 56 sujets :

- dans 30 cas, le pourcentage d'I. S. variait de 21 à 80 % (traces infimes d'anticorps)
- dans 16 cas, il était compris entre 81 et 99 % (faibles quantités d'anticorps, vérifiées en pratiquant le T. I. T. quantitatif).

Les bilans sérologiques ainsi observés sont en désaccord avec les conceptions de l'évolution des anticorps au cours de l'affection syphilitique. Il nous faut admettre que, chez certains malades, les réagines persistent aussi longtemps que les immobilisines ou bien que ces réagines n'ont pas une origine tréponémique. Effectivement, il a pu être établi, dans quelques cas, que la positivité partielle des réactions classiques était due à un phénomène biologique intercurrent, comme dans l'observation suivante :



OBSERVATION N° 5 :

Le sujet est un ancien "colonial" qui présentait le 12 décembre 1959, au cours d'une crise de paludisme, une sérologie classique faiblement positive :

KAHN V. D. R. L.  $\underline{+}$  , MEINICKE opacification - ,  
MEINICKE clarification  $\underline{+}$  ,  
DEMANCHE faiblement  $\underline{+}$  .

Le T. I. T. indiquait alors une immobilisation spécifique de 90 %.

Le malade ne présentait aucun signe clinique évoquant une tréponématose et se déclarait sans antécédents syphilitiques.

Le 10 février 1960, après l'institution d'un seul traitement anti-paludique, les réactions classiques étaient devenues toutes négatives et le T. I. T. s'était également négativé (0 % d'I. S. ).

On assiste donc, sans aucun traitement antisypilitique, à la négativation simultanée du T. I. T. et de la sérologie classique en 2 mois. Un tel phénomène ne peut s'expliquer que par le caractère partiel et passager de la positivité des réactions classiques qui évoque une fausse réaction biologique déclanchée par la crise de paludisme, la faible quantité d'immobilisines initialement constatée correspond à une infection tréponémique ancienne dont l'évolution a pu s'accomplir grâce à la prise antérieure d'antibiotiques par ce malade, et grâce également à son impaludéation antagoniste de *Treponema pallidum*.

Très souvent cependant, l'origine des réagines reste inconnue et nous pensons, personnellement, que les anciens syphilitiques présentent une aptitude particulière au développement de fausses réactions biologiques, les observations 3 et 4, ainsi que quelques autres semblables que nous avons pu faire, sont en faveur d'une telle hypothèse.

C) T. I. T. non interprétables :

Nous avons signalé que certains sérums soumis au T. I. T. provoquaient l'immobilisation des tréponèmes en l'absence de complément (dans le tube témoin) et rendaient ainsi le test non interprétable. Ces prélèvements étaient considérés comme tréponémicides.

Sur 4 103 sangs examinés, 121 sérums, soit 2,9 % ont



révélé un tel pouvoir tréponémicide dans un premier essai et examinés une nouvelle fois, après addition de pénicillinase, avaient perdu leur activité toxique. Il s'agissait donc de prélèvements effectués chez des sujets en cours de traitement par la pénicilline.

Par contre, 166 sérums, soit 4,1 % des échantillons testés, ont fait preuve d'un pouvoir tréponémicide au cours de 2 examens répétés et également après addition de pénicillinase.

Ce pourcentage varie d'un laboratoire à l'autre : GREGOR-CZYK (51) a noté 17,9 % de sérums toxiques non interprétables et SANDERS (146) 1,7 % lorsque les prélèvements provenaient d'un même hôpital alors qu'il était de 23,8 % lorsque les prélèvements lui étaient adressés par divers centres médicaux.

Les causes de l'activité toxique des sérums pour *Treponema pallidum* sont variées et ne sont pas toujours déterminées, elles peuvent résulter :

1) d'une contamination bactérienne qui entraîne la sécrétion de toxines microbiennes défavorables au tréponème (nous avons vérifié ce fait avec B. subtilis),

2) de la présence dans le sang d'un médicament anti-syphilitique autres que la pénicilline (cyanure, bismuth, arsenic, tétracycline etc...)

3) du passage dans le prélèvement d'impuretés diverses apportées par un emballage déficient (traces de détergent...); à ces constatations nous pouvons encore en ajouter une autre que nous avons observée et qui concerne un certain type de bouchon de caoutchouc de coloration bleue qui fermaient des flacons à prélèvement et étaient responsables de l'activité tréponémicide observée lors de l'examen des prélèvements contenus.

Les substances, qui entraînent l'activité tréponémicide de certains sangs, sont souvent présentés sous formes de traces infimes et peu stables qui disparaissent parfois par simple conservation à -20° C suivie d'un, deux ou plusieurs chauffages de 30 minutes à 56° C.

Il faut signaler également que les sérums frais ont souvent un pouvoir tréponémicide plus ou moins élevé qui peut être nettement mis en évidence en augmentant la dose de sérum mis en contact avec la suspension tréponémique, LAZZARO (73) a établi que cette activité immobilisante du sérum humain normal frais était due à sa richesse en properdine.





La toxicité d'un prélèvement pour le tréponème embarrasse et l'homme de laboratoire qui ne peut donner de résultats, et le praticien qui l'attend et comprend souvent mal ces "subtilités techniques de biologiste".

Pour cette raison, SANDERS et ses collaborateurs (146) ont mis au point une méthode qui leur a permis de rendre lisible par le T.I. T. 79 % des sérums toxiques, elle consiste à séparer la fraction euglobulinique du sérum en utilisant l'acide chlorhydrique dilué, à la température de 0°C, réalisée par immersion dans la glace fondante, les anticorps immobilisants passent dans cette fraction euglobulinique, alors que, dans le cas le plus général, les substances toxiques pour le tréponème restent dans le liquide surnageant.

---o0o---





CHAPITRE VII  
=====

ETUDE COMPAREE DU T. I. T. ET D'AUTRES  
=====

REACTIONS UTILISANT DES ANTIGENES TREPONEMIQUES  
=====



## CHAPITRE VII

### ETUDE COMPAREE DU T. I. T. ET D'AUTRES

### REACTIONS UTILISANT DES ANTIGENES TREPONEMIQUES

Nous avons pratiqué sur des sérums sanguins variés qui avaient été examinés par le T. I. T. , 4 types de réaction utilisant également un antigène tréponémique et qui sont :

- La réaction d'agglutination,
- La réaction de lyse,
- La réaction de fixation du complément,
- La réaction de résistance spécifique à la coloration.

#### 1) REACTION D'AGGLUTINATION DE MC LEOD ET MAGNUSON (Technique modifiée).

La réaction de Mc LEOD et MAGNUSON (81) o consiste à mettre en contact, pendant 2 heures à 35°C, une dose égale (0,10 ml) de sérum à expertiser et de suspension de *Treponema pallidum* (NICHOLS) tués au préalable par un chauffage de 40 minutes à 56°C. Dans ces conditions, les sérums de syphilitiques ont la propriété d'agglutiner les tréponèmes de manière plus ou moins intense. Le degré d'agglutination des spirochètes est apprécié par examen à l'ultra-microscope. En outre, les auteurs ajoutent aux réactifs en présence une quantité variable de sérum de bouvillon dont les congglutinines activent l'agglutination des germes (14).

Nous avons pratiqué la réaction de Mc LEOD et MAGNUSON en apportant quelques modifications à la technique générale dans le but d'obtenir de meilleurs résultats.

#### Technique modifiée :

##### 1) Préparation de la suspension antigénique :

Des lapins sont inoculés avec *Treponema pallidum* (NICHOLS) par voie intra-tésculaire selon la technique indiquée pour l'exé-



cution du T.I. T. L'orchite provoquée sera également utilisée de manière précoce, c'est-à-dire dans les 2 jours qui suivent son apparition.

Les testicules dilacérés sont plongés dans de l'eau physiologique pour éliminer le maximum de suc testiculaire. Ils sont ensuite traités par 10 ml d'eau physiologique. Le tout est placé à 35°C pendant 10 minutes sur un agitateur de KAHN, afin de faciliter la dispersion des tréponèmes dans le liquide. La suspension obtenue doit présenter environ 50 tréponèmes par champ. Elle est centrifugée et décantée à 2 reprises, chaque centrifugation est exécutée à 2 400 t/m pendant 10 minutes. Les débris tissulaires sont ainsi éliminés.

La suspension spirochétienne est alors additionnée de 20 mg de Pénicilline G sodique par 100 ml.

## 2) Exécution de la réaction :

Dans un tube type-hémolyse sont mis en contact :

|                                          |          |
|------------------------------------------|----------|
| Sérum à examiner, frais (pur ou dilué) : | 0,2 ml   |
| Suspension tréponémique                  | : 0,2 ml |
| Sérum de bouvillon                       | : 0,1 ml |

Les dilutions de sérum sont faites dans l'eau physiologique.

Les tubes sont agités à 35°C au moyen de l'agitateur de KAHN pendant 1 heure.

Chaque série de réactions comporte une série de témoins dont le protocole s'établit ainsi :

| Numéro des tubes         | 1      | 2      | 3      | 4      |        |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Suspension antigénique   | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
| Eau physiologique        | 0,3 ml | 0,2 ml |        |        |        |
| Sérum de bouvillon 1/5   |        | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Sérum positif (syphili-) |        |        |        | 0,2 ml |        |
| Sérum négatif            |        |        | 0,2 ml |        |        |
| Sérum à expertiser       |        |        |        |        | 0,2 ml |





Le témoin n° 1 constitue le témoin de la suspension anti-génique qui permet de vérifier l'absence d'agglutination spontanée.

Le témoin n° 2 permet le contrôle du sérum de bouvillon qui ne doit pas provoquer l'agglutination des tréponèmes.

Le témoin n° 3 est le témoin négatif vérifiant la spécificité de la réaction.

Le témoin n° 4 est le témoin positif qui permet de s'assurer de l'agglutination des tréponèmes en présence de sérum syphilitique.

### 3) Lecture de l'agglutination :

On dépose sur une lame de verre 0,05 ml du contenu de chaque tube, que l'on recouvre d'une lamelle de 18/18 mm. L'examen à l'ultra-microscope permet d'observer des agglutinats de tréponèmes plus ou moins importants, lorsque le sérum testé vient d'un sujet syphilitique. Dans ces conditions, le nombre des tréponèmes restés libres a considérablement diminué. On compare le résultat obtenu avec celui observé dans une préparation renfermant un sérum normal, celle-ci montre des spirochètes isolés dont le nombre est identique à celui dans les tubes 1 et 2.

Les résultats sont exprimés en fonction de la densité tréponémique par champ microscopique qui est calculée après examen d'au moins 10 champs.

L'interprétation des résultats est exprimée dans le tableau suivant :



| Tube considéré           | Densité tréponémique | Degré d'agglutination | Interprétation |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Témoin n° 1              | 20 T. P/ champ       | 0                     |                |
| Témoin n° 2              | 20 T. P/ champ       | 0                     |                |
| Sérums examinés          | 10 à 20 TP/champ     | 0                     | Négatif        |
| -                        | 5 à 10 TP/champ      | +                     | Douteux        |
| -                        | 2 à 5 TP/champ       | ++                    | Positif        |
| -                        | 0 à 1 TP/champ       | +++                   | Très positif   |
| TP = Treponema pallidum. |                      |                       |                |

Nous indiquons dans le tableau suivant n° 37 les résultats comparatifs fournis par 42 sérums variés examinés par la sérologie classique, le T. I. T. et le Test de MACLEOD-MAGNUSON (Technique modifiée) :

TABLEAU N° 37 - Résultats comparatifs de l'examen de 42 sérums variés par la sérologie classique, le T. I. T. et le Test de MACLEOD-MAGNUSON (Technique modifiée).

|                                   | Nombre de sérums ayant montré une positivité avec: |          |                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|----------|----------------------------------|
|                                   | Sérologie classique                                | T. I. T. | Test de MacLeod-Magnuson modifié |
| 24 sérums d'anciens syphilitiques | 12                                                 | 23       | 16                               |
| 15 sérums de non syphilitiques    | 2                                                  | 0        | 3                                |
| 3 sérums (syphilis récente)       | 3                                                  | 0        | 2                                |

Le test de MACLEOD-MAGNUSON modifié semble donc présenter une sensibilité légèrement supérieure à celle des réactions classiques, mais nettement inférieure à celle du T. I. T. dans les syphilis anciennes. Il montre par contre une précocité presque identique à celle de la sérologie classique dans les syphilis récentes.



Dans le cas de sujets révélant de fausses réactions positives, sa spécificité est apparue encore moins bonne que celle de la sérologie utilisant les antigènes lipidiques. Nous pensons que le phénomène d'agglutination est trop sujet à différents facteurs étrangers, pour que lui soit reconnue une certaine spécificité.

## II) TEST DE TANI MODIFIE : REACTION DE LYSE IN VIVO SPECIFIQUE de T. pallidum.

TANI, MATSURBARA et HAYASHI (152) ont observé l'inhibition de la mobilité des tréponèmes et leur lyse, en présence d'anticorps syphilitiques, dans la cavité péritonéale du cobaye. Ils évitent ainsi les manipulations du test d'immobilisation in vitro. Le "T. I. T. in vivo" réalisé de cette manière chez le cobaye s'apparente donc au phénomène de PFEIFFER dans lequel on assiste à la transformation granuleuse des vibrions cholériques dans le péritoine de cobaye, lorsque ces germes ont été mis en contact avec un sérum anticholérique avant leur injection. C'est pourquoi le Test de TANI a aussi été appelé :

Phénomène de PFEIFFER appliqué à Treponema pallidum.

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé la technique modifiée de VAISMAN et HAMELIN (166) qui s'établit ainsi :

La préparation antigénique est constituée par une suspension dans l'eau physiologique de *Treponema pallida* (NICHOLS), provenant d'orchite de lapins inoculés selon la technique décrite pour le T. I. T. Elle doit présenter une densité tréponémique de 50 tréponèmes par champ microscopique.

On effectue la sensibilisation en mettant en présence =

- 4 ml de suspension antigénique,
- 1 ml de sérum à examiner, préalablement inactivé,
- 1 ml de complément.

Après 30 minutes de contact à 35°C, le mélange est injecté dans le péritoine d'un cobaye.

On effectue l'examen du liquide péritonéal à l'ultra-microscope : deux ponctions de liquide sont faites, l'une 4 heures après l'injection, l'autre 7 heures après. On détermine le nombre total de tréponèmes pour 50 champs microscopiques.

Les réactions sont considérées comme négatives lorsqu'un





nombre assez élevé de tréponèmes isolés est retrouvé identique dans les 2 lectures, après 4 et 7 heures. Les réactions sont considérées comme positives lorsqu'un ne retrouve plus de tréponèmes dans le liquide de ponction de 4 heures, dans certains cas, il pourra encore persister quelque rares spirochètes, mais ceux-ci auront disparu à la 7 ème heure.

Dans le tableau suivant n° 38, nous avons rassemblé les résultats de l'examen comparatif de 15 sérums variés, pratiqué avec la sérologie classique, le T. I. T. et le Test de TANI modifié.

TABLEAU N° 38 - Examen comparatif de 15 sérums variés par la sérologie classique, le T. I. T. et le Test de TANI modifié :

|                               | Nombre de sérums ayant montré une positivité avec : |          |                      |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|----------|----------------------|
|                               | Sérologie classique                                 | T. I. T. | Test de TANI modifié |
| 5 sérums de non syphilitiques | 2<br>(B. F. P. R.)                                  | 0        | 0                    |
| 2 sérums (syphilis récente)   | 2                                                   | 0        | 1                    |
| 8 sérums (syphilis ancienne)  | 3                                                   | 7        | 5                    |

Ces résultats semblent indiquer la spécificité du Test de TANI qui est resté négatif avec les 2 sérums à sérologie classique faussement positive (B. F. P. R.). Dans un cas, il s'est montré plus précoce que le T. I. T. (syphilis récente). Sa sensibilité, dans les syphilis anciennes, apparaît comme intermédiaire entre celle de la sérologie classique et du T. I. T.

Les avantages de cette réaction résident essentiellement dans :

- la possibilité d'utiliser des suspensions de tréponèmes indifféremment mobiles ou non mobiles, fraîchement préparées ou conservées,

- et dans l'obtention de résultats valables pour les sérums non





interprétables par le T. I. T. du fait de leur caractère toxique pour le tréponème.

Par contre, nous avons noté, avec certains cobayes, un afflux leucocytaire assez important dans le liquide péritonéal, ce qui peut entraîner la phagocytose d'une partie des tréponèmes et une erreur par défaut. Cet inconvénient pourrait être évité par l'adjonction au mélange injecté d'une substance à chimiotactisme négatif pour les leucocytes, comme la quinine.

Enfin, l'addition de sérum de boeuf ou de bouvillon aux réactifs peut être également préconisée. Ce sérum renferme en effet une "autolysine" possédant la propriété d'activer les réactions de lyse (14).

## II) REACTION DE FIXATION DE COMPLEMENT AVEC UN ANTIGENE TREPONEMIQUE (Souche REITER).

Les tréponèmes de la souche REITER, cultivables in vitro, peuvent être utilisés comme antigène dans une réaction de fixation de complément pour le sérodiagnostic de la syphilis.

### 1) Origine et nature du tréponème de REITER :

L'origine et la nature de cette souche non pathogène a fait l'objet de controverses.

REITER (130) a rappelé récemment qu'il avait isolé et cultivé ce spirochète à partir d'un chancre syphilitique et qu'il considérait ce germe comme un *Treponema pallidum* authentique dont plus de 35 années de culture in vitro avaient modifié les caractéristiques morphologiques et pathogéniques.

Cependant, MEINICKE (86) a montré, par l'étude de la morphologie, de la biochimie, du comportement en milieux artificiels de culture, de l'absence de pathogénicité pour l'animal, la parenté étroite du tréponème de culture de REITER avec *Treponema calligyrum* et *Treponema genitale*.

Or, ces deux variétés de tréponèmes sont rencontrées comme saprophytes des organes génitaux humains. De plus, le tréponème de REITER inoculé dans le testicule de lapin ne détermine que des anticorps spécifiques vis-à-vis de lui seul, ces anticorps n'inhibent pas la mobilité des *Treponema pallidum* (Souche NICHOLS). On peut donc



penser que le tréponème qui fut isolé à partir du prélèvement de chancre par REITER était un spirochète saprophyte des organes génitaux.

Actuellement, le tréponème de REITER est rattaché à l'espèce *Treponema refringens*, saprophyte des organes génitaux, par de nombreux auteurs. Cette position est notamment admise par VINCENT (170).

Le tréponème de REITER peut être cultivé, soit dans un bouillon peptoné et glucosé, additionné à 10 % de sérum inactivé de cheval de lapin ou humain, soit dans le milieu de BREWER au thioglycolate également additionné à 10 % de sérum inactivé (54). L'anaérobiose n'est nullement nécessaire pour permettre la culture.

## 2) Valeur antigénique :

Les auteurs italiens, en particulier d'ALESSANDRO (24) (25) et PUCCINELLI (122) ont pu établir que 3 antigènes sont présents dans le tréponème de REITER :

- un antigène de nature protidique,
- un antigène de nature polysaccharidique,
- un antigène lipidique.

A chacun de ces antigènes, correspond, dans le sérum de syphilitique, un anticorps bien défini. Mais, du point de vue sérologique, l'antigène protidique est apparu comme le plus intéressant pour le diagnostic de la syphilis, tant par sa spécificité que par sa sensibilité.

En effet, l'antigène lipidique, extrait par l'alcool et l'éther, a donné des résultats superposables à ceux obtenus avec les extraits alcooliques de tissus animaux utilisés dans les réactions classiques.

L'antigène polysaccharidique, isolé par action de l'acide trichloracétique, se comporte comme un haptène et son activité sérologique encore mal connue semble être faible et inconstante.

L'antigène protidique peut être préparé par action du chlorure de potassium à froid, par cryolyse ou par action des ultra-sons. Il est susceptible de fixer le complément en présence de sérum syphilitique. De nombreux travaux se sont attachés à déterminer la nature de l'anticorps correspondant à cette fraction protéinique du tréponème de REITER et à préciser son intérêt dans le sérodiagnostic de la syphilis (6) (27) (117) (129) (143) (165). L'anticorps correspondant à l'antigène protidique est considéré comme différent de la réagine révélée par les antigènes





cardiolipidiques. Au cours de l'évolution de la tréponématose, son apparition est jugée contemporaine de celle des réagines dans la plupart des cas. Par contre, les différents auteurs lui accordent une persistance très variable en fin de maladie. Sa disparition est considérée comme se produisant en même temps que celle des réagines par certains chercheurs, pour d'autres, son élimination serait plus ou moins postérieure à celle des réagines et la réaction de fixation du complément avec l'antigène tréponémique souche REITER atteindrait une sensibilité très proche de celle du T. I. T. Sa spécificité est aussi appréciée de manières diverses, souvent elle est considérée comme nettement supérieure à celle des réactions classiques et quelquefois même elle est jugée parfaite.

Nous avons pratiqué la réaction de fixation de complément avec un antigène tréponémique - Souche REITER, sur un lot de sérums variés qui par ailleurs étaient examinés comparativement au moyen du T. I. T. et des réactions d'hémolyse et de floculation utilisant les antigènes cardiolipidiques.

### 3) Technique utilisée :

Nous avons employé l'antigène de l'Institut Pasteur, constitué par des tréponèmes, souche REITER, lavés puis désintégrés par action des ultra-sons et additionnés de glycérine pour assurer la conservation. L'antigène ultrasoné est considéré comme la meilleure de toutes les préparations réalisées à partir de tréponèmes de REITER, par les auteurs français (5) (54) (115).

La réaction de fixation de complément est pratiquée selon la technique de KOLMER (68) (30) que nous ne rappellerons pas. On exécute parallèlement la réaction de fixation de complément avec l'antigène cardiolipidique par cette même technique de KOLMER.

### 4) Résultats obtenus :

Nous indiquons dans le tableau suivant n° 39 la répartition des résultats de l'examen de 920 sérums par la réaction de fixation de complément avec l'antigène REITER, par le T. I. T. et par les réactions classiques avec antigènes cardiolipidiques (B. W. KOLMER, KAHN, V. D. R. L., MEINICKE-opacification et MEINICKE-clarification).





TABLEAU N° 39 - Résultats comparatifs de l'examen de 1 026 sérums par la réaction de fixation de complément avec l'antigène tréponémique (souche REITER), avec le T. I. T. et la sérologie classique. (Sérol. class.)

| Nombre<br>de<br>sérums | T. I. T.<br>% d'I. S.       | REITER | REITER | REITER | Sérol.<br>class. | Sérol.<br>class. | Sérol.<br>class. |
|------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------------|------------------|
|                        |                             | -      | +      | ++     | -                | +                | +                |
| 694                    | 0-20%<br>négatif            | 615    | 64     | 15     | 655              | 33               | 6                |
| 84                     | 21-50%<br>douteux           | 54     | 28     | 2      | 69               | 14               | 1                |
| 32                     | 51-80%<br>faible-<br>ment + | 16     | 14     | 2      | 20               | 10               | 2                |
| 12                     | 81-99%<br>+                 | 6      | 4      | 2      | 8                | 4                |                  |
| 204                    | 100 %<br>++                 | 36     | 77     | 91     | 56               | 84               | 64               |

L'examen de ce tableau nous montre que la réaction de fixation du complément avec l'antigène REITER s'est trouvée plus ou moins positive dans 11, 3 % des sérums négatifs au T. I. T. (dans 9, 0 % des sérums, cette positivité était très faible), la sérologie classique s'est révélée plus ou moins positive dans 5, 6 % de ces sérums négatifs au T. I. T. Or 2, 1 % de ces sérums provenaient de sujets atteints de syphilis primaire. On peut donc considérer que la sérologie classique n'était pas spécifique dans 3, 5 % des cas. Par contre, la réaction utilisant l'antigène REITER se révèle non spécifique dans 9, 2 % de ces sérums négatifs au T. I. T. soit dans 6, 3 % de tous les sérums examinés. Il faut toutefois remarquer que dans la plupart des cas, ces positivités non spécifiques sont extrêmement faibles (hémolyse presque totale). Elles sont rencontrées, en particulier, de façon fréquente dans le sang des femmes enceintes.

La réaction utilisant l'antigène REITER a été trouvée plus ou moins positive dans 66, 3 % des sérums qui avaient indiqué une positivité, à un degré variable, au T. I. T., alors que la sérologie classique avait donné des réactions positives dans 53, 9 % de ces sérums. La fixation de



complément avec l'antigène REITER a donc fait preuve d'une sensibilité nettement plus élevée que celle des réactions à antigènes cardiolipidiques. Cette plus grande sensibilité est notamment observée dans les cas de syphilis évoluées où le T. I. T. est de 100 % d'I. S. Des résultats de la réaction à l'antigène REITER concordent alors avec le T. I. T. dans 81,3 % des cas et avec ceux de la sérologie classique seulement dans 72,5 % des cas.

Il semble donc que les anticorps révélés par l'antigène tréponémique REITER persistent un peu plus longtemps que les réagines dans l'organisme en fin d'évolution de l'infection syphilitique. Ils sont cependant toujours éliminés avant les immobilisines et le T. I. T. conserve son incontestable supériorité dans ce cas.

Nous remarquerons que, parmi les épreuves utilisant les antigènes cardiolipidiques, la réaction d'hémolyse de KOLMER est celle dont les résultats s'approchent le plus de ceux obtenus avec la réaction à l'antigène REITER. Dans de nombreux cas de sérologie classique signalée comme positive partielle, seule la réaction de KOLMER était positive et accompagnait une réaction à l'antigène REITER positive : dans 56,6 % des réactions classiques positives partielles, la réaction de KOLMER était la seule positive et correspondait à une réaction à l'antigène REITER positive.

Cette observation confirme la supériorité de la sensibilité de la réaction d'hémolyse de KOLMER par rapport aux autres réactions utilisant les antigènes cardiolipidiques.

La réaction de fixation de complément avec l'antigène tréponémique ultrasoné-souche REITER nous paraît donc être d'un intérêt incontestable, sa sensibilité s'est nettement montrée supérieure à celle des réactions utilisant les antigènes cardiolipidiques, mais elle demeure toutefois inférieure à celle du T. I. T.

Par contre, nous estimons qu'elle présente un relatif manque de spécificité qui fait considérer comme suspectes les faibles positivités enregistrées avec cette réaction, accompagnées de réactions classiques et de T. I. T. négatifs.

#### IV) TEST DE RESISTANCE SPECIFIQUE de Treponema pallidum au BLEU DE METHYLENE de ROSENAU et KENT (141).

(Treponema pallidum methylene blue test = T. P. M. B. test)

Le principe du T. P. M. B. test consiste dans la perte de





l'affinité tinctoriale de *Treponema pallidum* pour le bleu de méthylène, lorsque le spirochète a été mis au préalable en contact avec des sérums de syphilitiques. Par analogie avec l'immobilisation spécifique " de NELSON et MAYER, le terme de "résistance spécifique au bleu de méthylène", a été créé par les auteurs, SABIN et FELDMAN (144). On vient utilisé un test analogue pour le sérodiagnostic des toxoplasmoses, en effet, *Toxoplasma gondii*, normalement colorable par le bleu de méthylène, perd cette propriété lorsqu'il a été mis au préalable en présence de sérum homologue.

### 1) Technique d'exécution :

Cette réaction se pratique d'une façon absolument parallèle à celle du T. I. T. Elle utilise la même suspension antigénique de *Treponema pallidum* virulents, la même dose de sérum et de complément, les mêmes témoins et le même temps de contact en anaérobiose à 35°C.

Chaque tube sert à préparer 2 lames, une lame sert à la lecture du T. I. T., la deuxième lame pour le T. P. M. B. test. A 0,025 ml de la préparation déposée sur cette lame, on ajoute 0,025 ml d'une solution de bleu de méthylène ainsi préparée :

- Bleu de méthylène      100 mg
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$                       25 mg
- Eau distillée q. s. p.    100 ml

Les lames sont laissées durant 15 minutes à la température du laboratoire en atmosphère humide. Les tréponèmes ayant conservé leur mobilité pendant le T. I. T. sont rapidement immobilisés par la solution de colorant. On détermine ensuite le pourcentage de tréponèmes colorés et de tréponèmes non colorés après examen de 50 microorganismes. Les tréponèmes colorés par le bleu de méthylène présentent une teinte rouge plus ou moins prononcée à l'ultra-microscope.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résistance spécifique à la coloration (S. D. R. = Specific Dye Resistance) absolument comme le pourcentage d'immobilisation spécifique du T. I. T. :

$$\% \text{ S. D. R. } = \frac{\text{TP CoL}/50 - \text{témoin}}{\text{TP col.}/50 - \text{réaction}} \times 100$$

TP col. /50 - témoin

TP col. /50-témoin:: nombre de *Treponema pallidum* colorés sur 50 dans le tube témoin (complément inactif),

TP col. /50 - réaction : nombre de *Treponema pallidum* colo-



l'affinité tinctoriale de *Treponema pallidum* pour le bleu de méthylène, lorsque le spirochète a été mis au préalable en contact avec des sérums de syphilitiques. Par analogie avec l'immobilisation spécifique "de NELSON" et MAYER, le terme de "résistance spécifique au bleu de méthylène", a été créé par les auteurs, SABIN et FELDMAN (144). On a utilisé un test analogue pour le sérodiagnostic des toxoplasmoses, en effet, *Toxoplasma gondii*, normalement colorable par le bleu de méthylène, perd cette propriété lorsqu'il a été mis au préalable en présence de sérum homologue.

#### 1) Technique d'exécution :

Cette réaction se pratique d'une façon absolument parallèle à celle du T. I. T. Elle utilise la même suspension antigénique de *Treponema pallidum* virulents, la même dose de sérum et de complément, les mêmes témoins et le même temps de contact en anaérobiose à 35°C.

Chaque tube sert à préparer 2 lames, une lame sert à la lecture du T. I. T., la deuxième lame pour le T. P. M. B. test. A 0,025 ml de la préparation déposée sur cette lame, on ajoute 0,025 ml d'une solution de bleu de méthylène ainsi préparée :

- Bleu de méthylène      100 mg
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$                       25 mg
- Eau distillée q. s. p.    100 ml

Les lames sont laissées durant 15 minutes à la température du laboratoire en atmosphère humide. Les tréponèmes ayant conservé leur mobilité pendant le T. I. T. sont rapidement immobilisés par la solution de colorant. On détermine ensuite le pourcentage de tréponèmes colorés et de tréponèmes non colorés après examen de 50 microorganismes. Les tréponèmes colorés par le bleu de méthylène présentent une teinte rouge plus ou moins prononcée à l'ultra-microscope.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résistance spécifique à la coloration (S. D. R. = Specific Dye Resistance) absolument comme le pourcentage d'immobilisation spécifique du T. I. T. :

$$\% \text{ S. D. R. } = \frac{\text{TP CoL/50 - témoin} - \text{TP col. /50 - réaction}}{\text{TP col. /50 - témoin}} \times 100$$

TP col. /50-témoin : nombre de *Treponema pallidum* colorés sur 50 dans le tube témoin (complément inactif),

TP col. /50 - réaction : nombre de *Treponema pallidum* colo-





rés sur 50 dans le tube à réaction (complément actif).

Nous devons signaler que nous avons rencontré une difficulté dans la réalisation de cet essai car certains sérums précipitaient au contact de la solution de bleu de méthylène, il se formait alors des agrégats qui rendaient pratiquement impossible l'examen à l'ultra-microscope.

## 2) Résultats de l'examen de 218 sérums variés par le T. P. M. B. test :

En dehors des examens non interprétables par suite d'une incompatibilité du sérum avec la solution de bleu de méthylène, les résultats du T. P. M. B. test se sont montrés rigoureusement parallèles à ceux du T. I. T.

Le T. P. M. B. test présente donc une sensibilité et une spécificité absolument identique à celle de la réaction de NELSON et MAYER. Nous avons pensé que son intérêt pourrait être alors de permettre l'expression de résultats avec les sérums toxiques pour le tréponème et non interprétables de ce fait par le T. I. T. En effet, au moment de la lecture du T. P. M. B. test, les tréponèmes sont morts car la solution de bleu de méthylène avec laquelle ils ont été mis en contact présente un pouvoir tréponémicide immédiat. On pourrait donc supposer que le fait que les tréponèmes aient été tués par leur contact avec le sérum toxique, avant l'adjonction de la solution colorante et tréponémicide, ne modifie pas le résultat du T. P. M. B. test.

Nous avons essayé alors de pratiquer cette réaction sur des sérums toxiques pour le tréponème, dans ces conditions, nous n'avons pu également tirer des conclusions avec le T. P. M. B. test; en effet la coloration des tréponèmes par le bleu de méthylène ne se produisait pas dans le tube à réaction, en présence de complément actif, mais elle était également empêchée dans le tube témoin comportant du complément inactivé. La résistance à la coloration ne peut plus alors être considérée comme traduisant l'action d'anticorps puisqu'elle est observée en l'absence d'alexine.

Afin de préciser ce phénomène, nous avons artificiellement rendu tréponémicides des sérums au moyen de traces de détergents (ammonium IV) et de pénicilline. Le T. P. M. B. test s'est montré non interprétable pour de tels sérums.

ROSENAU et KENT pensaient que la résistance dite "spécifique" des tréponèmes au bleu de méthylène était due à la formation d'un dépôt d'anticorps à la surface des microorganismes lors de leur contact



avec le sérum de syphilitique. Ces anticorps formeraient ainsi une couche imperméable empêchant le colorant de pénétrer dans le corps du spirochète. Cet anticorps était considéré par les auteurs comme véritablement identique aux immobilisines de NELSON, car les sérums absorbés par des suspensions de tréponèmes présentaient la même réactivité avec le T. P. M. B. test comme avec le T. I. T.

Il nous est apparu que, dans le T. P. M. B. test, ne sont colorés par le bleu de méthylène que les tréponèmes demeurés mobiles jusqu'à leur mise en contact avec la solution colorante. Les tréponèmes immobilisés, sous l'action des anticorps spécifiques ou d'une substance toxique, ne sont plus colorables. Ce phénomène explique la similitude des résultats que nous avons enregistrés avec le T. I. T. et le T. P. M. B. test, pour les mêmes sérums. Nous pensons donc que le T. P. M. B. test n'est pas une réaction immunologique, mais qu'il est tout simplement lié au phénomène de coloration vitale de *Treponema pallidum*.

Le T. P. M. B. test, qui nécessite donc le même matériel et la même technique que le T. I. T., conserve cependant un faible intérêt pour certains sérums douteux ou faiblement positifs, dans les cas de pourcentage d'I. S. partiel, la différenciation entre mobilité et immobilité du tréponèmes est en effet quelquefois délicate, surtout pour un observateur peu familiarisé, le T. P. M. B. peut permettre alors, dans une telle éventualité, de déterminer un résultat plus exact, en numérant tréponèmes colorés et tréponèmes non colorés par le bleu de méthylène.



CHAPITRE VIII  
=====

LE T. I. T. DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN  
=====





## CHAPITRE VIII

=====

### LE T. I. T. DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN

=====

Les immobilisines comme les réagines peuvent être décelées dans le liquide céphalo-rachidien, au cours des tréponématoses. La technique d'exécution du T. I. T. demeure identique.

L'intérêt de la recherche des anticorps immobilisants dans le L. C. R. est très diversement apprécié. Généralement le T. I. T. y est considéré positif dans les syphilis nerveuses et dans quelques cas de syphilis latente. Il est admis qu'un test positif dans le L. C. R. répond toujours à un test positif dans le sang (29) (33).

Nous avons étudié 311 liquides céphalo-rachidiens, ces prélèvements ont été soumis au T. I. T. et examinés également par la réaction d'hémolyse de DEMANCHE avec un antigène cardiolipidique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant n° 40



TABLEAU N° 40 - Examen de 311 L. C. R. par le T. I. T. et la réaction d'hémolyse de DEMANCHE ( à antigène cardiolipidique).

| Nombre de<br>L. C. R. | T. I. T.                                                  | B. W.<br>DEMANCHE | B. W.<br>DEMANCHE | B. W.<br>DEMANCHE | B. W.<br>DEMANCHE |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                       |                                                           | -                 | +                 | ++                | illisible         |
| 254                   | 0-20%<br>-                                                | 225               | 14                | 3                 | 9                 |
| 14                    | 21-50%<br>douteux                                         | 13                | 1                 |                   |                   |
| 5                     | 51-80%<br>faible-<br>ment +                               | 5                 |                   |                   |                   |
| 31                    | 81-100%<br>+                                              | 12                | 6                 | 11                | 2                 |
| 7                     | Non inter-<br>prétable<br>(L. C. R.<br>tréponé-<br>micide | 2                 | 1                 | 1                 | 3                 |

L'examen des résultats portés dans ce tableau, montre la faible proportion de L. C. R. trouvés positifs au T. I. T. Une positivité élevée (I. S. de 81 à 100 %) n'est trouvée que dans 10, 1 % des L. C. R. examinés alors qu'elle avait été constatée de 28, 0 % dans tous les sérums sanguins testés au cours de nos travaux. Cette proportion de L. C. R. très positifs est donc nettement moins importante malgré le caractère " a priori" plus spécifique des liquides reçus.

Il apparait également que, dans le L. C. R. , le T. I. T. est plus sensible que la sérologie classique :

- 16, 4 % des liquides examinés ont montré la présence d'immobilisines, en quantités plus ou moins importantes,

- 11,7 % des liquides ont révélé une sérologie classique à un degré plus ou moins élevé.



Mais cette sensibilité supérieure du T. I. T. par rapport aux réactions classiques est beaucoup moins nette que dans le sang.

Enfin, il est intéressant de noter qu'un pourcentage important (42,8 %) de L. C. R. toxiques pour le tréponème s'est montré également anti-complémentaire. Une semblable constatation avait été faite lors de l'examen des sérums sanguins.

Dans 105 cas, le T. I. T. a pu être effectué comparativement dans le sang et dans le L. C. R. d'un même malade. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau suivant n° 41.

TABLEAU N° 41 - Examen comparatif du sang et du L. C. R. de 105 sujets par le T. I. T. =

| Colonne N°<br>(éventualités) | 1  | 2      | 3 | 4  | 5      | 6  |
|------------------------------|----|--------|---|----|--------|----|
| T. I. T. dans le sang        | -  | -      | - | +  | +      | +  |
| T. I. T. dans le L. C. R.    | -  | +      | + | -  | +      | +  |
|                              |    | faible |   |    | faible |    |
| Nombre de sujets             | 26 | 1      | 0 | 48 | 7      | 23 |

L'analyse de ce tableau confirme qu'un T. I. T. positif dans le L. C. R. s'accompagne toujours d'un test positif dans le sang (colonnes 5 et 6), nous n'avons pas observé de véritable exception à cette règle (colonne 3). Dans un seul cas (colonne 2), un T. I. T. a été trouvé négatif dans le sang (4 % d'I. S.) et très faiblement positif dans le L. C. R. (32 % d'I. S.), mais ce faible pourcentage d'immobilisation spécifique obtenu avec le liquide ne permet pas de conclure à une exception.

Lorsque le T. I. T. atteint 100 % d'I. S. dans le L. C. R. et dans le sang d'un même malade, la teneur en immobilisines (révélée par un test quantitatif = recherche de la dilution du prélèvement provoquant 50 % d'I. S.) est toujours plus faible dans le L. C. R. que dans le sang. Nous n'avons pu cependant constater un rapport constant entre le titre en immobilisines du sang et du L. C. R. Ce rapport est extrêmement variable d'un individu à l'autre : il varie du 1/100 au 1/5.



On peut se demander si la présence d'immobilisines dans le L. C. R. témoigne d'une atteinte du tissu nerveux par le tréponème ou simplement d'un passage passif des anticorps du sang dans le L. C. R. par franchissement de la barrière méningée.

Nous avons remarqué que, chez 48 malades (soit 45,7 % des sujets examinés), les immobilisines présentées dans le sang faisaient défaut dans le L. C. R. Cependant pour 5 d'entre eux (soit 10,4 % des liquides ayant présenté un T. I. T. négatif), une syphilis nerveuse était signalée. On ne peut donc affirmer qu'un L. C. R. dépourvu d'anticorps immobilisants ne signifie pas toujours une absence d'atteinte syphilitique du système nerveux.

De plus, la négativation du T. I. T. est considérée comme beaucoup plus rapide dans le L. C. R. que dans le sang par différents auteurs DAFONSECA (21) a notamment déterminé que, chez les paralytiques généraux, le T. I. T. était négativé à la 3<sup>ème</sup> année de traitement dans le L. C. R. et à la 7<sup>ème</sup> année seulement dans le sang.

L'étude des rapports concernant la teneur en immobilisines et en réagines du sang et du L. C. R. d'un même individu nous est apparue encore plus complexe et il nous a été impossible d'établir de règles générales. Les différentes éventualités rencontrées sont signalées dans le tableau suivant N° 42.





TABEAU N° 42 - Répartition des résultats de l'examen du sang et du L. C. R. de 105 sujets par le T. I. T. et la sérologie classique

| Série N° | Nombre de cas | S A N G  |             | L. C. R. |             |
|----------|---------------|----------|-------------|----------|-------------|
|          |               | T. I. T. | Sér. class. | T. I. T. | Sér. class. |
| 1        | 16            | +        | +           | +        | +           |
| 2        | 1             | +        | +           | +        | -           |
| 3        | 6             | +        | +           | -        | -           |
| 4        | 5             | +        | -           | +        | +           |
| 5        | 8             | +        | -           | +        | -           |
| 6        | 3             | +        | -           | -        | +           |
| 7        | 39            | +        | -           | -        | -           |
| 8        | 4             | -        | +           | -        | +           |
| 9        | 2             | -        | +           | -        | -           |
| 10       | 3             | -        | -           | -        | +           |
| 11       | 17            | -        | -           | -        | -           |
| 12       | 1             | -        | -           | +        | -           |

L'analyse de ces résultats permet de constater un passage des réagines du sang au L. C. R. plus fréquent que celui des immobilisines :

- sur 28 cas de sérologie classique positive dans le sang , des réagines sont retrouvées dans 19 L. C. R. (Séries N° 1 et 8), soit chez 60,7 % de sujets,
- par contre, alors que les immobilisines sont présentés dans le sang de 78 malades, elles ne sont retrouvées dans leur L. C. R. que 30 cas (séries N° 1, 2, 4, 5), soit chez 38, 4 % de ces patients.

Cette observation trouve deux explications possibles : ou bien les réagines franchissent la barrière méningée beaucoup plus facilement que les immobilisines, ou bien les réagines, une fois présentés dans le L. C. R. en sont difficilement éliminées et, contrairement à ce qui est observé dans le sang, y persistent après les immobilisines.

Nous signalerons que, chez 3 sujets (série N° 6), on a noté la présence d'immobilisines et l'absence de réagines dans le sang et à l'inverse, seulement la présence de réagines dans le L. C. R. De telles



observations sont peu compatibles avec les conceptions actuelles de la sérologie de la syphilis. La persistance de la réagine dans le L. C. R., souvent à des titres peu élevés peut être invoquée, elle a été constatée par de nombreux auteurs (55) (62) (157).

En outre, les fausses réactions positives d'origine biologique sont considérées comme fréquente dans le L. C. R. (59), THOMAS (157) estime que des facteurs autres que l'infection tréponémique influencent la production de la réagine dans le L. C. R. chez les B. F. P. R. comme chez les sujets atteints de tréponématose. Les réactions classiques trouvées positives dans le L. C. R. des syphilitiques seraient alors souvent plus biologiques qu'immunologiques : ceci nous permettrait d'expliquer le caractère inhabituel du bilan des séroréactions dans le sang et le L. C. R. de certains malades. Ainsi, nous avons noté chez 4 sujets (série N° 8) l'existence de réagines d'origine non syphilitique dans le sang et dans le L. C. R. Chez 5 autres B. F. P. R., les réagines ne sont présentes que dans le sang (série n° 9) ou que dans le L. C. R. (série n° 10). Il est donc impossible de conclure à un passage ou à une absence de passage des réactions d'origine biologique du sang dans le L. C. R.

Nous signalerons que le L. C. R. des syphilitiques peut donner lieu à une réaction de fixation du complément avec l'antigène tréponémique souche REITER (69), les résultats se sont montrés sensiblement identiques à ceux des antigènes lipidiques.

En conclusion, l'examen du L. C. R. par le T. I. T. ne nous semble pas d'une grande utilité, étant donné la fréquence relativement faible des anticorps immobilisants dans ce liquide. Les rapports concernant l'apparition des immobilisines et des réagines dans le L. C. R. nous paraissent très variables d'un sujet à l'autre. Nous avons déjà signalé (11) que ces variations étaient peut être dues à une perméabilité de la méninge inégale d'un malade à l'autre comme dans de nombreuses méningites, tuberculeuses en particulier.

Il semble toutefois que les réagines manifestent une persistance plus prononcée dans le L. C. R. que dans le sang.

#### Présence d'anticorps immobilisants dans le liquide synovial :

Nous avons recherché si le liquide synovial pouvait renfermer des anticorps immobilisants au cours de l'infection syphilitique.

Nous avons ainsi testé le liquide de l'articulation du genou



de deux sujets présentant une arthropathie tabétique. Dans les deux cas, ce liquide a provoqué un pourcentage d'I. S. de 100 %. Les réactions classiques étaient également positives. Le sérum de ces deux malades renfermaient aussi des immobilisines (à un taux plus élevé que le liquide synovial, comme l'a montré le T. I. T. quantitatif) et des réagines. Après un délai d'un mois et administration d'un traitement antisyphilitique, le liquide synovial et le sang de l'un de ces patients présentaient toujours un T. I. T. positif à 100 % d'I. S. Par contre les réactions classiques n'étaient plus que partiellement positives, notamment dans le liquide d'articulation.

Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant n° 43.

TABLEAU N° 43 - Recherche d'anticorps immobilisants dans le liquide synovial

|                                                                  | Sujet N° 1           |       | Sujet N° 2                                   |                                              |
|------------------------------------------------------------------|----------------------|-------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                                  | T. I. T.<br>(I. S. ) | S. C. | 1° prélèvement<br>T. I. T. S. C.<br>(I. S. ) | 2° prélèvement<br>T. I. T. S. C.<br>(I. S. ) |
| SANG                                                             | 100 %                | ++    | 100 % ++                                     | 100 % +                                      |
| LIQUIDE<br>SYNOVIAL                                              | 100 %                | +     | 100 % +                                      | 100 % +                                      |
| Résultats du T. I. T. quantitatifs<br>Titre donnant 50 % d'I. S. |                      |       |                                              |                                              |
|                                                                  | Sujet N° 1           |       | Sujet N° 2                                   |                                              |
|                                                                  |                      |       | 1° prélèvement                               | 2° prélèvement                               |
| SANG                                                             | 1 500                |       | 1 000                                        | 800                                          |
| LIQUIDE<br>SYNOVIAL                                              | 200                  |       | 250                                          | 100                                          |

S. C. = Sérologie classique

I. S. = Immobilisation spécifique





Nous remarquerons que la teneur en immobilisines et en réagines du liquide d'articulation est inférieure à celle du sérum sanguin. Il semble, en outre, que le traitement ait provoqué, chez le sujet N° 2, une élimination des anticorps plus accélérée dans le liquide synovial que dans le sang.

---oOo---



CONCLUSIONS GENERALES  
=====



## CONCLUSIONS GENERALES

Le test d'immobilisation des tréponèmes est actuellement la seule réaction véritablement spécifique permettant la sérodiagnostic des tréponématoses, il constitue donc la "réaction de référence" de la sérologie de la syphilis. Les difficultés techniques de son exécution ne peuvent cependant rendre possible son emploi généralisé. Nous nous sommes attachés à préciser la valeur des résultats qu'il fournit.

Après avoir rappelé brièvement comment la recherche des anticorps tréponémiques avait conduit à la mise au point du test d'immobilisation par NELSON et MAYER, nous avons indiqué le principe et la technique générale de son exécution, en signalant la diversité actuelle des techniques des différents laboratoires qui pratiquent cette réaction.

Dans un premier chapitre, nous avons traité des problèmes posés par la conservation de la souche des tréponèmes et nous avons pu préciser l'influence de la qualité de l'inoculum sur le devenir de l'orchite syphilitique du lapin, et déterminer ainsi la densité tréponémique idéale de cet inoculum. La conservation des tréponèmes par le froid, pour leur emploi direct dans une réaction d'immobilisation, a été rejetée, ce procédé permet seulement la réalisation d'une réserve de sécurité, utilisable pour l'inoculation d'animaux neufs.

Dans le deuxième chapitre, a été envisagée la survie des tréponèmes qui constitue une des difficultés essentielles de la pratique du test d'immobilisation. Il existe de nombreuses formules de milieu de survie de *Treponema pallidum*, qui peuvent être semi-synthétiques ou biologiques. Leur examen a permis de retenir l'intérêt de divers composés. L'emploi de l'ultra-filtrat de sérum de boeuf a été particulièrement étudié et nous avons remarqué que son influence heureuse sur la survie était compensée par la quantité de complément ajoutée lors de l'exécution de la réaction d'immobilisation.

Une formule de milieu a été adoptée et elle a servi à préparer 24 lots différents dans lesquels la survie de *Treponema pallidum* a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré l'action favorable du sérum sanguin ajouté au milieu lors de la réalisation du test.



Cette influence du sérum permet de suppléer les déficiences possibles du milieu de survie, son mécanisme pourrait consister en la présence d'un facteur de survie sérique, en un enrichissement proteique du milieu et en une activité "anti-oxygène", que nous avons mise en évidence en étudiant la prolongation de la survie de *Treponema pallidum* en atmosphère aérobie par le sérum sanguin.

Dans le troisième chapitre, nous exposons la technique détaillée du test d'immobilisation, telle que nous l'avons pratiquée pour la conduite de nos essais.

L'intervention du complément et son influence sur les résultats de la réaction d'immobilisation, ont été envisagés dans le quatrième chapitre. Pour mener cette étude, nous avons pu mesurer la fixation de complément au cours de l'épreuve d'immobilisation, grâce à la mise au point d'un système hémolytique permettant un titrage quantitatif cinétique.

Les résultats obtenus n'ont pas permis d'invoquer l'intervention des immobilisines, ni celle des réagines, dans la fixation de "complément hémolytique" par le système = sérum syphilitique + tréponèmes, cette fixation pourrait être alors le fait qu'une autre catégorie d'anticorps.

Par ailleurs, ces résultats ont établi la non - identité de la fraction du complément à effet immobilisant sur le tréponème, et de la fraction à effet hémolytique.

Le cinquième chapitre a été consacré à l'étude de la reproductibilité des résultats du test d'immobilisation des tréponèmes, obtenus grâce à la technique proposée. Cette reproductibilité a été évaluée en fonction du taux d'anticorps à mettre en évidence. Nous avons pu déterminer que les pourcentages partiels d'immobilisation spécifique montraient la moins bonne reproductibilité. Par contre, dans les conditions habituelles de pratique courante, où l'on teste une grande majorité de sérums négatifs ou positifs donnant 100 % d'immobilisation spécifique, la reproductibilité était très satisfaisante.

Les déficiences de la reproductibilité ont fait l'objet d'une étude particulière.

Elle a porté,, d'une part, sur l'intervention des anticorps développés chez le lapin, au cours de l'évolution de son infection tréponémique. Ce travail a permis de mettre en évidence un phénomène immunologique local chez l'animal, en établissant la plus grande richesse du testi-





cule en immobilisines par rapport au sang, lors de l'évolution de l'orchite syphilitique. Parallèlement, la précocité de l'apparition des réagines dans le sang du lapin a été également notée. Les résultats de ces recherches ont permis d'éclairer le phénomène de sensibilisation in vivo des tréponèmes par le lapin.

L'étude cinétique de l'immobilisation in vitro des tréponèmes sensibilisés in vivo a montré la complexité du mécanisme de ce phénomène :

- 1) La fixation in vivo des anticorps sur *Treponema pallidum* ne s'effectuerait pas selon un mode identique à celle réalisée in vitro dans le T. I. T. .
- 2) L'immobilisation pourrait être esquissée dans le milieu testiculaire.
- 3) Enfin, les anticorps restés libres dans le testicule pourraient passer dans la suspension antigénique et être en partie responsable du phénomène de sensibilisation des tréponèmes.

D'autre part, l'influence de la survie générale des tréponèmes sur la reproductibilité des résultats a été démontrée. Une élévation importante du pourcentage d'immobilisation spécifique a été observée pour les sérums faiblement positifs renfermant des traces d'immobilisines, dans les essais où la survie générale avait été artificiellement abaissée. Les tréponèmes semblent donc plus sensibles à l'action des anticorps immobilisants quand les conditions de survie deviennent défavorables. Au cours de cette étude, où la pénicilline a été utilisée pour diminuer la survie, nous avons pu constater que le complément exalte le pouvoir immobilisant de cet antibiotique sur *Treponema pallidum*.

Enfin, la sensibilité du test d'immobilisation, peut être améliorée par différents procédés dont nous avons retenu celui consistant en l'étude comparative d'une dose habituelle de sérum et d'une dose doublée. Cette technique a permis de déceler des traces d'anticorps immobilisants dans des cas douteux.

Dans le sixième chapitre, nous donnons les résultats d'une étude de la valeur du test d'immobilisation des tréponèmes par rapport à la sérologie classique utilisant les antigènes cardiolipidiques. Les deux épreuves ont été pratiquées comparativement sur un nombre élevés de sérums de sujets sains et syphilitiques.



La spécificité du test d'immobilisation n'a jamais été mise en cause, et sa sensibilité, dans les cas de syphilis anciennes, s'est révélée double de celle des réactions classiques.

Nous nous sommes particulièrement attachés à rechercher la signification des traces d'immobilisines décelées dans certains sérums.

Un nombre assez élevé de "syphilis sérologique", latente et asymptomatique, a été constaté, en utilisant le test d'immobilisation qui a permis également de déceler des "fausses réactions positives" de la sérologie classique. Différentes observations nous ont paru s'inscrire en faveur d'une aptitude particulière des anciens syphilitiques au développement de ces fausses réactions.

Enfin, nous avons observé la toxicité pour le tréponème de quelques prélèvements sanguins qui ne pouvaient alors fournir de résultats de test d'immobilisation, les traces tréponémicides renfermées dans ces échantillons conservent souvent une origine inconnue.

Dans le septième chapitre, le test d'immobilisation des tréponèmes a été comparé à d'autres réactions utilisant des antigènes tréponémiques.

La réaction d'agglutination de Mac LEOD et MAGNUSON dont nous avons modifié la technique d'exécution reste moins sensible et n'est pas toujours spécifique.

La réaction de lyse in vivo des tréponèmes dans le péritoine de cobaye est apparue difficile à réaliser et sa sensibilité, dans les cas de syphilis anciennes, n'a pas atteint celle de la réaction d'immobilisation.

La réaction de fixation du complément avec un antigène tréponémique ultrasoné de la souche cultivable des tréponèmes de REITER a fait l'objet d'une étude importante; sa sensibilité s'est nettement montrée supérieure à celle des réactions utilisant les antigènes cardiolipidiques; mais nous avons constaté qu'elle demeure inférieure à celle du test d'immobilisation. Sa spécificité est apparue également imparfaite.

La réaction de résistance à la coloration au bleu de méthylène de *Treponema pallidum*, qui nécessite le même matériel et la même manipulation que la réaction d'immobilisation, a fourni des résultats superposables à ceux de cette réaction. Le test de résistance au bleu de méthylène n'a pas permis l'examen des sérums toxiques pour le trépo-



nème. Nous avons établi que ce test n'était pas une véritable réaction immunologique, mais qu'il était dû aux propriétés de coloration vitale de *Treponema pallidum*.

Enfin, le dernier chapitre livre les conclusions d'une étude concernant la valeur du test d'immobilisation des tréponèmes dans le liquide céphalo-rachidien. L'examen d'un nombre élevé de liquides a montré le relatif intérêt de cet examen. Nous n'avons pu établir de véritables rapports entre l'apparition et l'élimination des réagines et des immobilisines du liquide céphalo-rachidien et du sang, ces rapports se sont révélés très variables d'un individu à l'autre, les réagines ont toutefois montré une persistance plus prononcée par rapport aux immobilisines dans le liquide céphalo -rachidien.

Des anticorps immobilisants ont été mis en évidence dans le liquide synovial de l'articulation du genou de malades souffrant d'arthropathie tabétique.





BIBLIOGRAPHIE  
=====



BIBLIOGRAPHIE

=====

- (1) ANDERSON (R. I. ), KENT (J. F. ), SANDERS (R. W. ) - Frozen syphilo-  
matous rabbit testes as source of Treponema pallidum for the immo-  
bilization test for syphilis.  
Amer. J. Syph. 1954, 38, 527.
- (2) AUDRAN (R. ) - Biologie du complément.  
Biol. méd. 1960, 49 , 364.
- (3) BARUCCI (M. ), MORI (F. ) - Iposeti di lavoro e primi risultati sull'uso  
dell' A. C. T. H. e del cortisone per la riattivazione delle reazioni sie-  
rologiche per la lue.  
Rass. Studi psichiat. 1956, 45, 1173.
- (4) BASSET (A. ) DAGUET (G. ) MONFORT (J. ) - Réactions de réagines  
persistantes avec tests d'immobilisation négatifs.  
Ann. Derm. Syph. (Paris) 1957, 84, 143.
- (5) BAZEX (A. ), SALVADOR (R. ) - Résultats du Test de NELSON et  
pratique des antigènes tréponémiques ultasonés (souche REITER) à la  
clinique des maladies cutanées et syphilitiques de TOULOUSE.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1960, 67, 796.
- (6) BEKKER (J. H. ) - Specificity and sensitivity of the REITER protein  
complement - fixation test.  
Brit. J. vener. Dis. 1959, 35, 128.
- (7) BELLONE (A. G. ), BONELLI (M. ) - Rilievi sulla sopravvivenza del  
Treponema pallidum in siero umano e sua eventuale utilità nel test  
di NELSON-MAYER.  
G. ital. Derm. Sif. 1957, 98, 188.
- (8) BERLINGHOFF (W. ) - Über ein neues Ueberlebensmedium für die  
Treponemen beim Treponema pallidum Immobilisations-Test.  
Derm. Wschr. 1956, 133, 318.
- (9) BERLINGHOFF (W. ) LANGBEIN (H. ) - Syphilis connata und NELSON-  
Test.  
Derm. Wschr. 1958, 138, 1029.



- (10) BERLINGHOFF (W.) VOGEL (G.) - Der Nelson-Test als Kriterium für den Erfolg der antisypilitischen Behandlung.  
Archiv. Klin. exp. Derm. 1959, 209, 76.
- (11) BEUREY (J.) LEVY (E.) - Le test de NELSON à la clinique Dermatologique de NANCY.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1960, 67, 607.
- (12) BOAK (R. A.) MILLER (J. N.) - A simple medium for maintaining the viability of Treponema pallidum in the Treponema pallidum immobilization test.  
Am. J. Syph. 1954, 38, 429.
- (13) BONCINELLI (V.) VACCARI (R.) PINCELLI (L.) - Il problema dei risultati dubbi del test di NELSON - MAYER : accorgimenti tecnici per la loro interpretazione.  
G. ital. Derm. Sif. 1957, 98, 218.
- (14) BORDET (J.) GAY (F. P.) - Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine.  
Ann. Inst. Pasteur 1906, 20, 467.
- (15) BOREL (L. J.) - Characteristics of resistance or susceptibility of Treponema pallidum to unfavourable factors.  
Brit. J. vener. Dis. 1956, 32, 94.
- (16) BOREL (L. J.) - Nouvelle technique pour la production de l'orchite aiguë précoce syphilitique chez le lapin.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1952, 32, 146.
- (17) BOREL (L. J.) BENTEJAC (R.) DUREL (P.) MARIEN (J.) - Lyophilized survival medium for the Treponema pallidum immobilisation test.  
Brit. J. vener. Dis. 1958, 34, 241.
- (18) CANNEFAX (G. R.) - Streptomycin, Sodium azide, and merthiolate as bacteriostatic agents for use with the Treponema pallidum immobilization test. Brit. J. vener. Dis. 1959, 35, 53.
- (19) CHORPENNING (F. W.), BEERS (D. B.) - The effect of added Calcium on treponemal immobilization.  
J. Immunol. 1960, 85, 240.
- (20) CHORPENNING (F. W.), SANDERS (C. R.) KENT (J. F.) - Treponemal immobilization test using organisms from frozen testis.  
Amer. J. Syph. 1952, 36, 401.



- (21) DA FONSECA (A.) RAMOS (S.) - Alguns aspectos da reacção de imobilização tréponêmica nos paralticos gerais em tratamento.  
Soc. port. Derm. Vener. 1957, 15, 151.
- (22) DAGUET (G.) - Nouveautés américaines concernant le test d'immobilisation des tréponèmes.  
IIIème coll. marseil. de la Soc. franç. Derm. Syph. "Le T. P. I. test de NELSON-MAYER"  
MASSON édit. Paris 1953.
- (23) DAGUET (G.) - Treponema pallidum immune adherence and haemagglutination.  
Brit. J. Vener. Dis, 1956, 32, 96.
- (24) D'ALESSANDRO (G.), DARDANONI (L.) - Isolation and purification of protein antigen of REITER treponeme, study of its serologic reaction.  
Amer. J. Syph. 1953, 37, 137.
- (25) D'ALESSANDRO (G.), ODDO (F.), COMES (R.), DARDANONI (L.) - Sulla struttura antigene del Treponema pallidum.  
Ricerche sullo stipite coltivabile di REITER.  
Riv. Ist. sieroter. ital. 1949, 24, 134.
- (26) DEACON (W. E.), FALCONE (V. H.), HARRIS (A.) - A fluorescent test for treponemal antibodies.  
Proc. Soc. exp. Biol. 1957, 96, 477.
- (27) DE BRUIJN (J. H.) - The application of a protein derived from Treponema pallidum (REITER strain) as an antigen in the serodiagnosis of syphilis.  
Acta dermat. venereol. Proc. IIth. Internat. Congr. Derm. 1957, II, 720.
- (28) DELACRETAZ (J.) - Etude d'un nouveau milieu de survie pour les tréponèmes pâles, utilisable pour le test d'immobilisation (Reaction de NELSON).  
Ann. Derm. Syph. (Paris) 1953, 80, 501.
- (29) DELACRETAZ (J.), CHAPUIS (H.) - Le test d'immobilisation des tréponèmes pâles dans le liquide céphalo-rachidien.  
Rev. med. Suisse rom. 1956, 76, 897.





- (30) DEMANCHE (R. ) - Précis de technique du sero-diagnostic de la syphilis.

Doin édit. Paris 1954.

- (31) DURAN-REYNALS (F. ) - Tissue permeability and spreading factors in infection, contibution to host parasite problem.

Bact. Rev. 1942, 6, 197.

- (32) DUREL (P. ) - Technique employée à l'Hôpital Saint-Lazare pour le test d'immobilisation.

IIIème coll. marseil. Soc. franç. Derm. Syph. "Le TPI test" de NELSON-MAYER, 277 MASSON édit. Paris, 1953.

- (33) DUREL (P. ), BOREL (L. J. ), LOUIS (J. ) - Résultats de test d'immobilisation dans le liquide céphalo-rachidien.

IIIème coll. marseil. Soc. franç. Derm. Syph. "Le T. P. I. test" de NELSON-MAYER, 149,, MASSON édit. Paris, 1953.

- (34) DUREL (P. ), SAUSSE (A. ) - Rappel de l'origine de la souche tréponémique NICHOLS. Conservation de sa virulence pour l'homme après 40 ans.

Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1954, 61, 139.

- (35) EAGLE (H. ), STEINMANN (M. C. ) - The nutritinal requirements of treponemata.

J. Bact. 1948, 56, 163.

- (36) EBERSON (F. ) - Immunity studies in experimental syphilis.

Arch. Derm. Syph. (Chicago) 1921, 4, 490.

- (37) EHRMANN (G. ) RAAB (W. ) - Zur Technik des Treponema-pallidum Immobilisation Testes.

Derm. Wschr. 1960, 142, 921.

- (38) ENG (J. ) - A note on the course of reagin titres in chronic biologic false positive reactors.

Brit. J. vener. Dis. 1959, 35, 44.

- (39) ENG (J. ), KORNSTADT (L. ) - T. P. I. in blood donors with presumably chronic biologic false positive serologic syphilis tests.

Acta Derm. Venereol. Proc. II Ith. Congr. Derm. 1957, III, 771.



- (40) FEGELER (F.) - Treponema pallidum immobilisierende Wirkung von Penicillin, Streptomycin, Tetracyclinen, und Erycin in vitro.  
Hautarzt 1957, 8, 176.
- (41) FEGELER (F.), KAUER (I.) - Stimulierende Wirkung von Antibiotika auf das Treponema pallidum.  
Hautarzt 1959, 10, 512.
- (42) FLORES-CEVALLOS (L.) - Distribution de quelques dermatoses parasitaires suivant les différentes zones de climat du Pérou.  
Acta Derm. Venereol. Proc. IIth. Congr. Derm. 1957, III, 834.
- (43) FRIBOURG-BLANC (A.) - Les anticorps immobilisants des tréponèmes dans la syphilis (I) Principe et aleas de leur détermination.  
Ann. Derm. Syph. (Paris) 1957, 84, 286.
- (44) FRIBOURG-BLANC (A.) - Les anticorps immobilisants des tréponèmes dans la syphilis (II) Technique et interprétation du T. I. T.  
Ann. Derm. Syph. (Paris) 1957, 84, 410.
- (45) FRIBOURG-BLANC (A.), NIEL (G.) - Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la syphilis.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1960, 67, 946.
- (46) FUCHS (A.) AHRENS (W.) - Neue zeitund materialsparende Möglichkeiten bei der Herstellung des Basalmediums für den NELSON-MAYER Test.  
Schweiz, Z. allg. Path. Bakt. 1959, 22, 844.
- (47) GASTINEL (P.), COLLART (P.) - Problèmes de l'immunité dans la syphilis expérimentale.  
IIIème coll. marseil. Soc. franç. Derm. Syph. "Le T. P. I. test de NELSON-MAYER" 25  
MASSON édit. Paris, 1953.
- (48) GASTINEL (P.), COLLART (P.), SAUSSE (A.), BOREL (L. J.) - Le test d'immobilisation de NELSON dans la syphilis expérimentale du lapin.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1952, 59, 50.
- (49) GASTINEL (P.), DELARUE (P.) NEVOT (V.), COLLART (P.) - Nouvelles recherches sur l'immunité dans la syphilis expérimentale. Immunité locale.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1934, 1967



- (50) GASTINEL (P. ), HAMELIN (A. ) VAISMAN (A. ) DUROYER (F. ) -  
Recherches sur la lyophilisation et la conservation par le froid de  
quelques spirochètes.

Ann. Inst. Pasteur 1958, 94, 249.

- (51) GREGORCZYK (K. ), HENSCHLER (M. ) GREIFELT (A. ) - Zum Pro-  
blem der nicht verwertbaren Resultate (Toxisches Verhalten) im  
Nelson test.

Derm. Wschr. 1958, 138, 1244.

- (52) GREIFELT (A. ) - Ueber morphologische Veränderungen des Trepone-  
ma pallidum in Nelson test.

Derm. Wschr. 1954, 129, 181

- (53) GUTHE (T. ) - The treponematoses as a world probleme Brit. J.  
vener. Dis. 1960, 36, 67.

- (54) HAMELIN (A. ) Les antigènes tréponémiques.

Thèse Pharm. Paris 1959-Librairie  
François.

- (55) HAMELIN (A. ), VAISMAN (A. ) - Etude comparative des réactions  
avec antigènes tréponémiques et lipidiques dans le liquide céphalo-  
rachidien.

Ann. Inst. Pasteur 1960, 98, 924.

- (56) HARDY (N. ) - Le test d'immobilisation des tréponèmes.

Biol. Méd. 1958, 47, 181.

- (57) HAUSER (G. ), GODELFER (L. ) - Recent advances in serodiagnostic  
test for syphilis.

J. Louisiana Sch. Med. 1956, 108, 331.

- (58) HENTSCH (H. ) - Lues, Frambösie, Ulcusplicum : eine Krankheit.

S. Haut. u. Geschl. Kr. 1955, 19, 364.

- (59) HOFF (H. ), SCHINKO (H. ) - Die Liquordiagnostic der Neurolyues.

Wien. med. Wschr. 1960, 110, 278.

- (60) HUDSON (E. H. ) - Bejel : non venereal syphilis.

Arch. Derm. Syph. (Chicago) 1936, 33, 994.





- (61) Journal officiel (5 février 1958) p. 558 - Réponse du Ministre de la Santé, sur la fréquence de la syphilis. (Question posée par M. P. FERRAND à l'Assemblée Nationale).
- (62) KALZ (F. ), SCOTT (A. ) - Evaluation of the clinical and serological state of 416 well-treated neurosyphilis after long term observation.  
Acta Derm. Venereol. 1958, 38, 155.
- (63) KENT (D. ) - Symposium of Recent Advances in venereal diseases.  
WASHINGTON (1952).
- (64) KHAN (A. S. ), NELSON (R. A. ), TURNER (T. B. ) - Immunological relationships among species and strains of virulent treponeme as determined with the treponemal immobilization test.  
Amer. J. Hyg. 1951, 53, 296.
- (65) KIMM (G. E. ), ALLEN (R. H. ), MORTON (H. J. ), MORGAN (J. F. ) - Enhancement of survival in vitro of Treponema pallidum by addition of glucose and magnesium.  
J. Bact. 1960, 80, 726.
- (66) KING (A. J. ) - An examination of the treponemal immobilization test in the investigation of positive serological test for syphilis in pregnancy.  
Acta Derm. Venereol. Proc. IIIth. Congr.  
Derm. 1957, III, 776.
- (67) KOCHS (A. ) - Bejel, seine Besonderheiten und seine Beziehung zur Syphilis. 1958, 9, 125.
- (68) KOLMER (J. A. ), BOERNER (W. ) - The serodiagnosis of syphilis.  
United States Government Printing Office.  
WASHINGTON, 1939.
- (69) KOSTANT (G. H. ), LANDY (J. E. ), MILER (J. N. ), KELCEC (L. C. ) - Treponemal tests on cerebral fluid.  
Arch. Derm. (Chicago) 1959, 80, 439.
- (70) LANDES (E. ) - Ueber die Morbidität der Lues.  
Medizinische 1959, 38, 1752.
- (71) LAPORTE (R. ), HARDRE de LOOZE (L. ), SILLARD (R. ) - Contribution à l'étude du complément. I Inactivation spontanée dans les conditions de l'hémolyse. Action protectrice des ions calcium.  
Ann. Inst. Pasteur 1955, 89, 16.



- (72) LAURELL (A. ), NILSSON (I. M. ) - Hypergammaglobulinemia circulating anticoagulant and biologic false positive Wassermann reaction.  
J. Lab. clin. Med. 1957, 49, 694.
- (73) LAZZARO (C. ) - Ricerche in vitro sul potere treponemicida del "sistema del properdin" del siero di sangue umano normale.  
Minerva Derm. 1959, 4, 278.
- (74) LEBOEUF (M. F. ) - La lyse du tréponème, cause d'erreur dans la lecture du Test de NELSON.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1956, 63, 260.
- (75) LEDBETTER (R. K. ), CUMMING (R. J. ) - Use of Streptomycin to combat contamination of Treponema pallidum suspensions in the T. P. I. test.  
Brit. J. vener. Dis. 1954, 30, 214.
- (76) LEGLER (A. ) Ueber unspezifisch positive Reaktions ausfälle der Cardiolipin Komplementbindungreaktion.  
Z. Immun. Forsch. 1958, 115, 342.
- (77) LEVADITI (C. ), MARIE (A. ) - Les "Anticorps syphilitiques" dans le liquide céphalo-rachidien des paralytiques généraux.  
Ann. Inst. Pasteur 1907, 21, 138.
- (78) LEVADITI (C. ), VAISMAN (A. ), HAMELIN (A. ) - Bismuthothérapie expérimentale de la syphilis et réaction de NELSON et MAYER.  
Bull. Acad. nat. Méd. 1952, 136, 367.
- (79) LINTAS (N. ) - La nostra esperienza sul test di NELSON-MAYER nel liquido cefalo rachidiano.  
Dermatologica 1958, 9, 217.
- (80) LORENZO (J. A. ) NELSON survival medium.  
Montevideo-Uruguay  
W. H. O. /T. P. I. /5, 1957, 51.
- (81) MAC LEOD (C. P. ), MAGNUSON (H. J. ) - Agglutination of Treponema pallidum in syphilitic serums.  
Publ. Hlth. Rep. 1953, 68, 747.
- (82) MAISLER (A. ), DANILA (P. ), STEFANESCU (F. ), MARINESCU (G. ) - Serologia penetrului diagnosticul sifilisului in bolile infectioase si in



stari febrile diverse.

Derm. Venereol. (Bucarest) 1956, 1, 77.

- (83) MAGNUSON (H. J. ), ROSENAU (B. J. ), GREENBERG (B. G. ) - The effects of castration, and testosterone upon the susceptibility of rabbits to experimental syphilis.

Amer. J. Syph. 1951, 35, 146.

- (84) MARCHAL (J. G. ), BEUREY (J. ) PIERSON (M. ), DEIBER (J. ) LEVY (E. )

Le test d'immobilisation des tréponèmes à NANCY. Premiers résultats.

Bull. Soc. Pharm. NANCY 1959, 41, 11.

- (85) MARGNI (R. A. ) El test de NELSON-MAYER.

Rev. Ass. bioquim. argentin. 1959, 24, 121.

- (86) MEINICKE (K. ) - Tierexperimentelle und derologische Untersuchungen zur Trennung der Kulturtreponemen (REITER) von virulente Treponema pallidum.

HAUTARZT 1956, 7, 448.

- (87) MEINICKE (K. ) - Züchtungsversuche des Treponema pallidum auf künstlichem Nährboden.

HAUTARZT 1956, 7, 407.

- (88) MERKLEN (F. P. ), MIKOL (C. ) - Influence de la cortisone en injection unique sur le taux de la réagine syphilitique.

C. R. Soc. Biol. (PARIS) 1956, 12, 2177.

- (89) MILLER (J. N. ), BEAK (R. A. ), CARPENTER (Ch. M. ) - Sensitivity of the Treponema pallidum immobilization test : a function of the number of spirochaetes in the antigen.

Brit. J. vener. Dis. 1958, 34, 246.

- (90) MILLER (J. N. ) MEYER (P. G. ) PARROTT (N. A. ) HILL (J. H. ) - A study of the biologic falsely positive reaction for syphilis in children.

J. Pediat. 1960, 4, 548.

- (91) MILLER (J. N. ), SLATKIN (M. H. ), HILL (J. H. ) - Significance of the Treponema pallidum immobilization test on spinal fluid.

J. Amer. med. Ass. 1956, 160, 194.

- (92) MIZUMOTO (R. ), HAYASCHI (O. ) - Influences of P<sup>32</sup> upon antibody titer of syphilis.

ToK. J. exp. Med. 1959, 24, 113.





- (93) MUTERMILCH (S. ), GERARD (S. ) - Actions de divers antibiotiques sur le tréponème de REITER - Test d'activité possible de ces antibiotiques dans la syphilis.  
Ann. Inst. Pasteur 1957, 93, 435.
- (94) NELSON (R. A. ) - Factors affecting the survival of *Treponema pallidum* in vitro.  
Amer. J. Hyg. 1948, 48, 120.
- (95) NELSON (R. A. ) - Le test d'immobilisation des tréponèmes et le phénomène de l'adhérence-disparition dans la syphilis.  
Presse méd. 1952, 60, 1719.
- (96) NELSON (R. A. ) - The immune-adherence phenomenon an immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis.  
Science 1953, 118, 733.
- (97) NELSON (R. A. ), DIESENDRUCK (J. A. ) - Studies of treponemal immobilizing antibodies in syphilis.  
J. Immun. 1951, 66, 667.
- (98) NELSON (R. A. ), MAYER (M. M. ) - Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibodies produced in syphilitic infection.  
J. exp. Med. 1949, 89, 369.
- (99) NICHOLS (H. J. ), HOUGH (W. ) - Demonstration of *Spirochaete pallida* in the cerebrospinal fluid from a patient with nervous relapse following the use of salvarsan.  
J. Amer. med. Ass. 1913, 60, 108.
- (100) NICOLAU (J. G. ), BADANOIV (A. ), NICOLAU (G. ) - Untersuchungen zum Mechanismus der serologischen Luesreaktionem.  
Arch. klin. exp. dermat. 1958, 207, 230.
- (101) NIELSEN (H. A. ) - Investigations on the reproductibility of the quantitative *Treponema pallidum* immobilization test.  
Acta path. microbiol. scand. 1957, 40, 119.
- (102) NIELSEN (H. A. ), METZGER (M. ) - Incidence of *Treponema pallidum* immobilizing antibody in rabbit immune sera against various types of microorganisms and virus.  
Brit. J. vener. Dis. 1959, 35, 241.





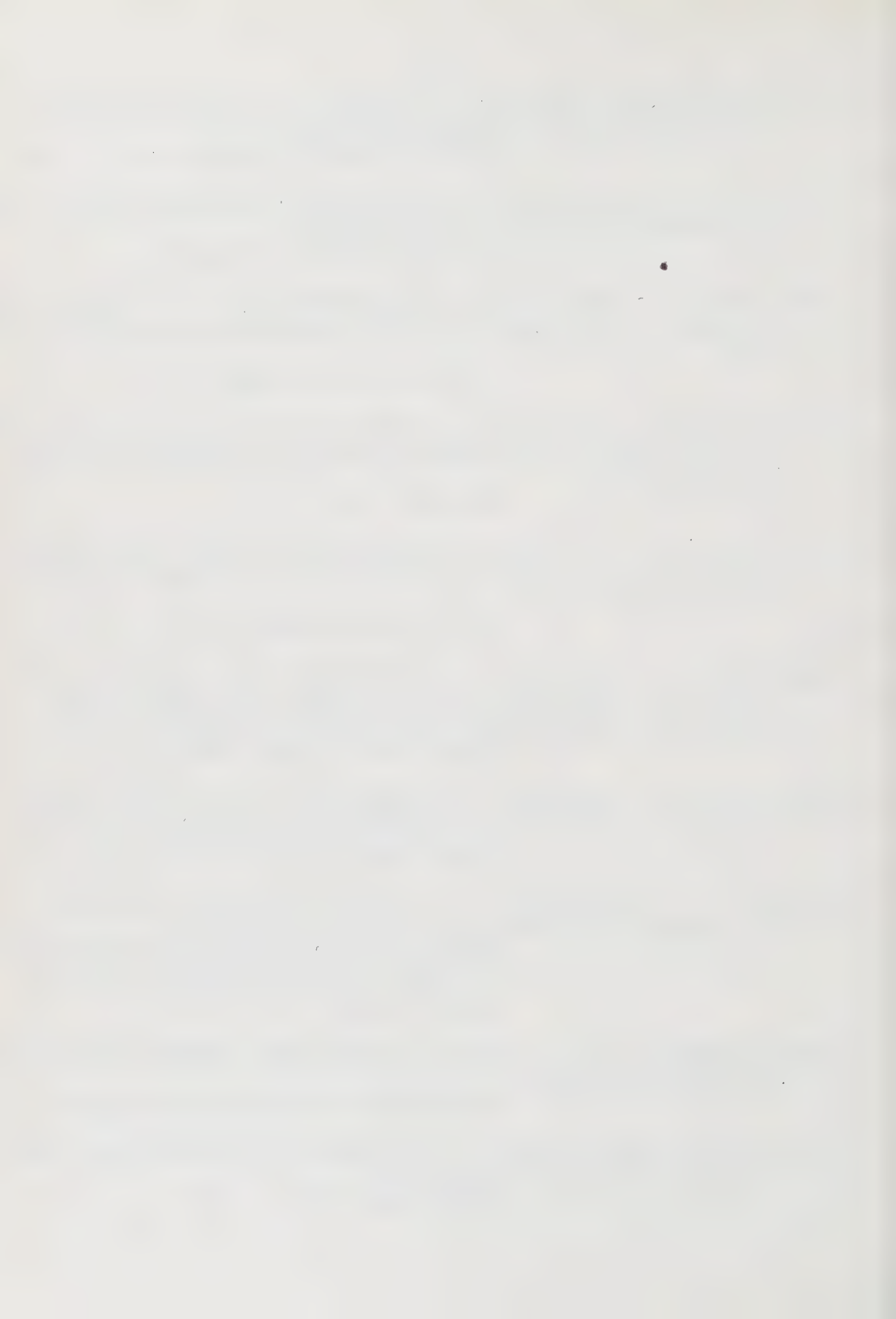
- (103) OLANSKY (S. ), MAC CORMICK (G. ) - Experiences with the fluorescent treponemal antibody test for syphilis.  
Arch. Derm. (Chicago) 1960, 81, 59.
- (104) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1954 addendum,  
8
- (105) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1954, 4
- (106) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1954, 7
- (107) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1957, 11
- (108) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1957, 16
- (109) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1957, 60
- (110) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1958, 33
- (111) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1958., 81
- (112) Org. mond. Santé-Serv. Rapp. techn. WHO/TPI 1960, 31
- (113) OTTOLENGI-LODIGIANI (F. ), SPAGNOLI (U. ) - Gli anticorpi delle frazioni sieriche separati per flusoforesi nel corso della sifilide umana e sperimentale III  
G. ital. Derm. Sif. 1959, 100, 129.
- (114) PANGBORN (M. ) - New serologically active phospholipid from beef heart.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1941, 48, 484.
- (115) PAUTRIZEL (R. ), BONNARDOT (R. F. ), SZERNOVICZ (F. ) - La sérologie de la syphilis avec un antigène constitué de tréponèmes de culture désintégrés par les ultra-sons.  
Ann. Inst. Pasteur. 1957, 92, 586.
- (116) PERUCCIO (L. ) - Reazioni sierologiche aspecifiche per la lue in donatori di sangue.  
Minerva dermat. 1956, 31, 287.
- (117) PETERSON (E. T. ), DE HAVEN (R. C. ), WRIGHT (E. T. ) MILLER (J. N. ) The REITER protein complement fixation (R. P. C. F. ) test.  
Amer. J. clin. Path. 1960, 34, 231.



- (118) PLANCHET (L.) - Les résultats faussement positifs des réactions sérologiques aux antigènes cardiolipidiques dans la lèpre.  
Maroc méd. 1963, 1113
- (119) PORTELLA (O. B.) - Improved conditions permitting quantitative T. P. I. studies.  
Acta dermat. venereol. Proc. IIth. Congr. Derm. 1957, III, 790.
- (120) PORTELLA (O. B.), THOMPSON (W. B.) - Kinetics of the Treponema immobilization reaction under improved conditions.  
Brit. J. vener. Dis. 1957, 33, 189.
- (121) PORTNOY (J.), HARRIS (A.), OLANSKY (S.) - Studies of Treponema pallidum immobilization test, effect of increased sodium thioglycolate and complement.  
Amer. J. Syph. 1953, 37, 101.
- (122) PUCINELLI (V.) - Considération sur la valeur clinique de la recherche de différents anticorps dans le sang du syphilitique.  
IIème coll. mars. Soc. franç. Derm. Syph.  
"Le T. P. I. test de NELSON-MAYER",  
131 Masson édit. Paris, 1953.
- (123) RANQUE (J.), DEPIEDS (R.) - Influence du CO<sub>2</sub> sur le phénomène d'immobilisation spécifique des tréponèmes.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1957, 151, 1404.
- (124) RANQUE (J.), DEPIEDS (R.), MOIGNOUX (J. B.) - Etude de la lyse de Treponema pallidum (souche NICHOLS) en fonction de doses croissantes de complément.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1952, 146, 1226.
- (125) RANQUE (J.), MOIGNOUX (J. B.), DEPIEDS (R.) - Etude comparée des survies de Treponema pallidum (souche NICHOLS) en divers milieux sériques.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1952, 146, 1224.
- (126) RANQUE (J.), SENEZ (J. C.), DEPIEDS (R.) - Essai sur la survie de Treponema pallidum (souche NICHOLS).  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1957, 151, 1407.



- (127) RANQUE (J.), TEMINE (P.), TRAMIER (G.) - Inoculation accidentelle professionnelle de *Treponema pallidum*.  
Bull. Soc. franç. Derm. Syph. 1960, 67, 139.
- (128) REBOUL (E.), OLIVIER (L.), BEDIEZ (J.) - Quelques aspects de la syphilis dite sérologique en milieu militaire.  
Rev. Hyg. Méd. Soc. 1958, 6, 261.
- (129) REIN (C. H.), KELCEC (L.), D'ALESSANDRO (G.) - DE BRUIJN (J.) - Sensitivity and specificity of REITER protein complement fixation-test.  
J. invest. Derm. 1957, 28, 208.
- (130) REITER (H.) - Ueber den sog "REITER-STANN" der Spirocheta pallida, seine Geschichte, Isolierung, Fortzüchtung, Spezifität und Verwendungsmöglichkeiten.  
Med. Welt. 1960, 14, 712.
- (131) RESTA (V.), SAPUPPO (A.), ROSETTI (G.) - Sulla realizzazione del test di NELSON-MAYER con l'uso del terreno all'estratto embrionario di ratto liofilizzato.  
Minerva. Derm. 1956, 31, 147.
- (132) RESTA (V.), ROSSETTI (C.), MARSON (G.) - Studio del titolo degli anticorpi immobilizzanti nel siero di sangue e nel liquido di bolla mediante la valutazione quantitativa col test di NELSON-MAYER.  
Minerva med. (Torino) 1955, 30, 232.
- (133) RESTA (V.), SAPUPPO (A.), ROSSETTI (C.) - L'uso del terreno all'embrione di ratto per la realizzazione del test di NELSON-MAYER.  
Minerva med. (Torino) 1954, 45, 892.
- (134) REYN (A.), NIELSEN (H. A.) - Technique du T. P. I. se rapportant spécialement aux problèmes de survie des tréponèmes.  
IIIème coll. marseil. Soc. franç. Derm. Syph.  
"Le T. P. I. test de NELSON-MAYER", III  
MASSON, éditeur Paris 1953.
- (135) REZNIKOVA (L. S.) - Antigeny iz rastitel nykh veshchestv dlia serologicheskikh na sifilis.  
Vest. vener. Derm. (Moskva) 1956, 30, 44.
- (136) RICE (F.), NELSON (R. A.) - The isolation from beef serum of a survival factor for *Treponema pallidum*.  
J. Biol. Chem. 1951, 191, 35.





- (137) RIVASSEAU-COUTANT (A. ) - Recherches expérimentales sur la syphilis congénitale du lapin.  
Thèse Pharm. Bordeaux 1958.
- (138) RODILLON (J. ) - Le clapier modèle. p. 143  
S. Borneman éditeur - Paris, 1942.
- (139) ROLLIER (R. ), PLANCHET (H. ) - Essai d'interprétation des fausses séroréactions dans la lèpre.  
Maroc. Ed. 1957, 1957, 1206.
- (140) ROSENAU (B. J. ), KENT (J. F. ) - Procedure for increasing the sensitivity of tests for specific treponemal antibody.  
J. Lab. clin. Med. 1958, 51, 664.
- (141) ROSENAU (B. J. ), KENT (J. F. ), SANDERS (R. W. ) - Resistance of specifically-sensitized Treponema pallidum to methylene blue stain.  
Proc. Soc. exp. Biol. 1956, 91, 579.
- (142) ROSSETTI (C. ), MARSON (G. ) - Studio del titolo degli anticorpi in luet ci trattari con cortisone.  
Minerva dermat. 1956, 31, 292.
- (143) RUGE (H. J. ) - Role of Treponema REITER in modern serology of syphilis.  
Brit. J. vener. Dis. 1956, 32, 242.
- (144) SABIN (A. B. ), FELDMAN (H. A. ) - Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma).  
Science 1948, 108, 660.
- (145) SAINT-LEE (W. ) - Laboratory studies in systemic lupus erythematosus.  
Arch. Derm. Syph. (Chicago) 1956, 73, 313.
- (146) SANDERS (R. W. ), PPIPER (D. ), HOOK (W. A. ), MOSCHEL (L. ) - Non specific immobilization in the T. P. I. test  
Am. J. clin. Path. 1960, 33, 135.
- (147) SATSUMA (S. ) - Studies on the syphilitic seroreaction of the patients with cervical cancer.  
J. Jap. obstet. gynaec. Soc. 1957, 4, 223.



- (148) SAULAPPE (J.) - Du T. I. T. en série chez les nourissons.  
Thèse Méd. Paris 1956.
- (149) SAUSSE (A.) - Technique du test d'immobilisation des tréponèmes.  
Ann. Biol. Clin. 1951, 9, 490.
- (150) SCARPA (C.), IPPOLITO (F.) - Terapia tetraciclinica parenterale della  
lue sieroresistente in latenza tardiva.  
Dermat. 1957, 8, 113.
- (151) SEQUEIRA (P. J.) Morphology of Treponema pallidum.  
Lancet 1956, 6946, 749.
- (152) TANI (T.), MATSUBARA (M.), HAYASCHI (T.) - Pfeiffer's phenome-  
non of syphilis spirochetes and active immunization against syphilis.  
Jap. J. Med. Soc. Biol. 1955, 101, 367.
- (153) TANI (T.), OGIUTI (K.) - Das Wesen der Syphilisimunität Die Spiro-  
chätozide Fähigkeit des Syphilisserums.  
Jap. J. Exp. Med. 1936, 14, 457
- (154) THIERS (H.) La resurrection de la syphilis primo-secondaire.  
J. Méd. Lyon 1959, 10, 869.
- (155) THIVOLET (J.), ROLLAND (M.) - Sur la substitution de l'albumine  
humaine à l'albumine bovine dans le milieu de survie de NELSON  
pour Treponema pallidum.  
Ann. Inst. Pasteur 1952, 83, 415.
- (156) THIVOLET (J.), ROLLAND (M.) - Utilisation du test d'immobilisa-  
tion des tréponèmes de NELSON-MAYER dans le domaine de la sy-  
philis sérologique latente.  
Presse méd. 1956, 64, 497.
- (157) THOMAS (E. W.) - Bloff ans spinal fluid tests for reagin after treat-  
ment of neurosyphilis.  
J. Amer. med. Ass. 1953, 153, 718.
- (158) THOMPSON (F.), MAGNUSON (H. J.) - Studies for increasing the  
sensibility of the treponemal immobilization test for syphilis.  
Amer. J. Syph. 1951, 35, 21.
- (159) TOURAINÉ (A.) - Les anticorps syphilitiques -  
Thèse Méd. Paris 1912 - Steinheil Editeur.



- (160) TOURAINÉ (A. ) - Epidemiologie de la syphilis et facteurs éventuels de la tendance actuelle à la recrudescence.  
Presse méd. 1957, 65, 1851.
- (161) TOURAINÉ (A. ), JEANSELME (E. ) - Action des sérums humains sur le *Treponema pallidum*.  
J. méd. franç. 15 octobre 1911.
- (162) TURNER (T. B. ), FLEMMING (W. L. ) - Prolonged maintenance of spirochetes and filtrable viruses in frozen state.  
J. exp. Med. 1939, 70, 629.
- (163) TURNER (T. B. ), FLEMMING (W. L. ), BRAYTON (N. L. ) - Protective antibodies in the serum of human syphilitics.  
J. Clin. Invest. 1939, 18, 471.
- (164) TURNER (T. B. ), HOLLANDER (D. H. ) - Studies on the mechanism of action of cortisone in experimental syphilis.  
AMER. J. Syph. 1954, 38, 371.
- (165) VAISMAN (A. ), HAMELIN (A. ) - L'antigène tréponémique de REITER dans le sérodiagnostic de la syphilis.  
Proph. antivéner. 1956, 28, 208.
- (166) VAISMAN (A. ), HAMELIN (A. ) - Nouvelle méthode de sérodiagnostic de la syphilis in vivo ou phénomène de PFEIFFER appliqué à *Treponema pallidum*.  
Proph. antivener. 1959, 31, 277.
- (167) VAISMAN (A. ), HAMELIN (A. ) - Séparation des réagines et des immobilisines tréponémiques des sérums par l'ultracentrifugation.  
C. R. Acad. Sc. 1952, 234, 156.
- (168) VINCENT (D. ), BAZEX (A. ) SALVADOR (R. ) - Localisation électrophorétique de la réagine syphilitique par la méthode bidimensionnelle.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 1960, 154, 820.
- (169) VINCENT (P. ) - Un milieu de survie pour les tréponèmes pâles utilisable pour le test de NELSON.  
Ann. Inst. Pasteur. 1957, 93, 539.
- (170) VINZENT (A. ) - Cours supérieur de Microbiologie de l'Institut Pasteur. 1956, 414.  
Cité par DUMAS (J. ) - Bactériologie médicale. Flammarion édit. Paris 1858, 838f.



- (171) WARING (G. Wjr), LANES (A. S.), MESCON (H.) - Biological false positive results in serologic test for syphilis findings in a low socioeconomic population group.  
J. Amer. med. Ass. 1958, 168, 2004.
- (172) WASSERMAN (A.), NEISSER (A.), BRUCK (C.) - Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis.  
Deutsch. Med. Wochenschr. 1906, 19, 745.
- (173) WEBER (M.) - Factors influencing the in vitro survival of Treponema pallidum.  
Amer. J. Hyg. 1960, 71, 401.
- (174) YOSHIDA (J.) - Etude sur l'immunité des spirochétoses. L'immunité locale dans la syphilis.  
Ac. Derm. 1930, 16, 196.





# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                  | Pages |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| INTRODUCTION : Les anticorps tréponémiques.                                                                      | 6     |
| Principe du T. I. T.                                                                                             | 8     |
| Technique générale                                                                                               | 8     |
| CHAPITRE I : Conservation de la souche de tréponèmes                                                             | 11    |
| 1) Origine et virulence de la souche de tréponèmes.                                                              | 12    |
| 2) Obtention d'un matériel antigénique constant et important.                                                    | 13    |
| a) Qualité de l'inoculum                                                                                         | 14    |
| b) Etat de l'animal d'expérience                                                                                 | 19    |
| c) Rôle du facteur de diffusion de DURAN-REYNALS                                                                 | 19    |
| 3) Evolution unilatérale de l'orchite syphilitique                                                               | 20    |
| 4) Conservation des tréponèmes par le froid                                                                      | 21    |
| a) Utilisation de tréponèmes conservés par le froid pour l'inoculation de lapins.                                | 21    |
| b) Utilisation de tréponèmes conservés par le froid pour la préparation de la suspension antigénique du T. I. T. | 21    |
| 5) Technique de l'inoculum                                                                                       | 23    |
| a) Préparation de l'inoculum                                                                                     | 23    |
| b) Inoculation des animaux                                                                                       | 24    |
| CHAPITRE II : Survie des tréponèmes                                                                              | 25    |
| 1) Milieu de NELSON et MAYER                                                                                     | 26    |
| a) Composition du milieu de NELSON et MAYER                                                                      | 26    |
| b) Constituants du milieu de NELSON et MAYER                                                                     | 27    |
| Milieu de NELSON additionné de diverses substances                                                               | 29    |
| 3) Milieux biologiques                                                                                           | 34    |
| a) Milieux à base de sérum sanguin                                                                               | 34    |



|                |                                                                                                                                                                  |             |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                | b) Milieux divers à base d'autres<br>liquides biologiques                                                                                                        | Pages<br>38 |
|                | 4) Lyophilisation des milieux de survie                                                                                                                          | 40          |
|                | 5) Constitution du milieu utilisé dans nos recherches                                                                                                            | 40          |
|                | 6) Résultats obtenus - Influence favorable du sérum<br>sanguin sur la survie des tréponèmes                                                                      | 43          |
| CHAPITRE III : | Technique d'exécution du T. I. T.                                                                                                                                | 54          |
|                | I) Préparation de la suspension antigénique                                                                                                                      | 54          |
|                | II) Exécution de la réaction                                                                                                                                     | 56          |
|                | III) Lecture du test                                                                                                                                             | 58          |
|                | IV) Contrôle du mélange gazeux                                                                                                                                   | 61          |
| CHAPITRE IV :  | Rôle du complément                                                                                                                                               | 64          |
|                | a) Titrage préalable du lot de complément                                                                                                                        | 65          |
|                | b) Titrage du complément résiduel                                                                                                                                | 66          |
|                | c) Fixation de complément au cours du<br>T. I. T.                                                                                                                | 67          |
|                | 1) Influence de la concentration en<br>globules rouges du système hémolytique                                                                                    | 68          |
|                | 2) Influence de la teneur en sérum<br>hémolytique du système hémolytique                                                                                         | 69          |
| CHAPITRE V :   | Reproductibilité du T. I. T.                                                                                                                                     | 77          |
|                | I) Evaluation de la reproductibilité                                                                                                                             | 77          |
|                | a) Variation de la reproductibilité en<br>fonction du taux d'anticorps                                                                                           | 78          |
|                | b) Etude de la reproductibilité des pour-<br>centages d'I. S. allant de 10 à 99 %                                                                                | 81          |
|                | c) Etude de la reproductibilité des résul-<br>tats de 500 sérums variés                                                                                          | 83          |
|                | II) Tentative d'explication des déficiences<br>de la reproductibilité                                                                                            | 84          |
|                | A) Lyse des tréponèmes                                                                                                                                           | 84          |
|                | B) Développement d'anticorps tréponémiques<br>chez le lapin et sensibilisation des trépo-<br>nèmes par ces anticorps, au cours de l'é-<br>volution de l'orchite. | 85          |
|                | 1) Réponse immunologique, observée<br>dans le sang du lapin, à la suite de<br>l'inoculation de T. pallidum                                                       | 85          |
|                | 2) Réponse immunologique locale du<br>lapin à l'inoculation                                                                                                      | 89          |



|                                                                                                        | Pages |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3) Phénomène de sensibilisation des tréponèmes au cours de l'évolution de l'orchite du lapin.          | 92    |
| 4) Inhibition de la production d'anticorps du lapin                                                    | 99    |
| C) Influence de la survie générale des tréponèmes sur la reproductibilité des résultats du T. I. T.    | 101   |
| 1) Milieu de survie impropre                                                                           | 103   |
| 2) Présence d'une substance tréponémicide                                                              | 103   |
| 3) Modification de l'une des constantes biologiques de T. pallidum                                     | 103   |
| III) Amélioration de la sensibilité                                                                    | 106   |
| 1) Allongement du temps de réaction                                                                    | 106   |
| 2) Diminution de la densité tréponémique de la suspension antigénique                                  | 107   |
| 3) Augmentation de la dose de sérum expertisé                                                          | 107   |
| 4) Action du calcium                                                                                   | 108   |
| 5) Action de la cocarboxylase                                                                          | 109   |
| CHAPITRE VI) : Etude comparée du T. I. T. et des réactions utilisant les antigènes cardiolipidiques    | 110   |
| I) Spécificité du T. I. T.                                                                             | 111   |
| II) Réagines et immobilisines                                                                          | 112   |
| 1) Nature différente des réagines et des immobilisines                                                 | 112   |
| 2) Evolution des anticorps au cours de la syphilis                                                     | 113   |
| III) Analyse des résultats obtenus                                                                     | 115   |
| A) T. I. T. négatifs                                                                                   | 117   |
| B) T. I. T. positifs                                                                                   | 121   |
| 1) Sérums riches en anticorps immobilisants                                                            | 122   |
| 2) Sérums pauvres en anticorps immobilisants                                                           | 125   |
| C) T. I. T. non interprétables                                                                         | 126   |
| CHAPITRE VII) : Etude comparée du T. I. T. et d'autres réactions utilisant des antigènes tréponémiques | 129   |
| I) Réaction d'agglutination de McLEOD et MAGNUSON                                                      | 130   |





|                                                                                     | Pages |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| II) Test de TANI modifié , réaction de lyse in vivo spécifique de T. pallidum       | 134   |
| III) Réaction de fixation de complément avec un antigène tréponémique-souche REITER | 136   |
| 1) Origine et nature du tréponème de REITER                                         | 136   |
| 2) Valeur antigénique                                                               | 137   |
| 3) Technique utilisée                                                               | 138   |
| 4) Résultats obtenus                                                                | 138   |
| IV) Test de résistance spécifique de T. pallidum au bleu de méthylène               | 140   |
| 1) Technique d'exécution                                                            | 141   |
| 2) Résultats obtenus                                                                | 142   |
| CHAPITRE VII) : Le T. I. T. dans le liquide céphalo-rachidien                       | 144   |
| Présence d'anticorps immobilisants dans le liquide synovial.                        | 150   |
| CONCLUSIONS GENERALES                                                               | 153   |
| BIBLIOGRAPHIE                                                                       | 159   |



UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

--:--:--:--:--

THESE

presentee par Mr Etienne LEVY

Ne le 30 août 1935 à NANCY

nationalite : Française

et portant le titre : Contribution a l'etude de la  
valeur du test d'immobilisation des tréponemes.

Vu

NANCY le 1961

Le President de these

vu et approuve

NANCY le 5-7-61

Le Doyen de la Faculté

vu et permis d'imprimer

NANCY, le 6 JUILLET 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'UNIVERSITE



*P. Imbs*  
P. IMBS







